

N° d'ordre : 433

N° attribué par la bibliothèque : 07ENSL0433

# THESE

*en vue d'obtenir le grade de*

***Docteur de l'Université de Lyon – Ecole Normale Supérieure de Lyon***

***Spécialité Sciences de la Vie***

***Laboratoire de l'IGFL***

***Ecole Doctorale de Biologie Moléculaire Intégrée et Cognitive***

*Présentée et soutenue publiquement le 14/12/2007*

*Par Mademoiselle Elsa KRESS*

---

***Titre :***

***ETUDE DU ROLE DU RECEPTEUR NUCLEAIRE AUX HORMONES  
THYROÏDIENNES TR $\alpha$ 1 DANS LA PROLIFERATION NORMALE ET  
PATHOLOGIQUE DE L'EPITHELIUM INTESTINAL***

---

*Directeur de thèse : Madame Michelina PLATEROTI*

*Après avis de : Madame Michèle KEDINGER  
Monsieur Laurent SACHS*

*Devant la commission d'examen formée de :*

*Madame Béatrice DESVERGNES, Membre  
Madame Michèle KEDINGER, Membre/rapporteur  
Monsieur Ioan NEGRUTIU, Membre  
Madame Michelina PLATEROTI, Membre  
Monsieur Laurent SACHS, Membre/rapporteur  
Monsieur Jacques SAMARUT, Membre*

Par quelle nécessité des hommes mettent-ils tant de passion, prennent-ils tant de plaisir à vouloir éternellement explorer le monde, l'interroger ? A cette question, ceux qui aiment la science répondent : par curiosité, par désir de s'appropriier la nature, d'améliorer le sort de l'homme. Ceux qui n'aiment pas la science disent : par ambition, par volonté de puissance, amour de la gloire ou même cupidité. Mais ce n'est pas tout. Il y a des facteurs plus profonds. Il y a la tentative, la tentative de comprendre un monde qui se dérobe. La révolte contre la solitude. Contre une réalité qui vous échappe, qui vous ignore et sans laquelle il n'y a pas de vie. Une exigence métaphysique de cohérence et d'unité, dans un univers qu'on cherche à posséder mais qu'on ne parvient pas même à saisir. La nature n'est pas silencieuse. Elle répète éternellement les mêmes notes qui nous parviennent lointaines, diffuses, sans accords ni mélodie. Mais nous ne pouvons nous passer de mélodie. Nous l'avons cherchée désespérément sur la terre et dans le ciel avant de nous apercevoir que personne, jamais, ne viendrait nous jouer la musique espérée. Que c'est à nous de plaquer les accords, d'écrire la partition, de faire jaillir la symphonie, de donner aux sons une forme que, sans nous, ils n'ont pas. Telle était, à mes yeux, la fonction de la science.

François Jacob, in La Statue Intérieure

# Sommaire

<b>Sommaire</b>	<b>2</b>
<b>Remerciements</b>	<b>5</b>
<b>Abréviations</b>	<b>7</b>
<b>INTRODUCTION</b>	<b>9</b>
<b>Première partie : L'INTESTIN</b>	<b>10</b>
<b>I. Développement et maturation de l'intestin</b>	<b>10</b>
<b>A. L'intestin grêle chez la souris</b>	<b>10</b>
1. Le tube digestif	10
a) Structure de l'intestin adulte	10
b) Développement du tube digestif	13
2. L'intestin juvénile	14
3. L'intestin adulte, structure et fonction	14
a) Les cytotypes de l'épithélium intestinal	14
b) Les cryptes intestinales	16
c) Les cellules souches de l'épithélium intestinal	18
<b>B. Métamorphose de l'intestin chez le xénope</b>	<b>21</b>
1. La métamorphose, principes généraux	21
2. La métamorphose de l'intestin	21
a) Structure de l'intestin du têtard	21
b) Les remodelages durant la métamorphose	22
c) Les progéniteurs épithéliaux chez le xénope	24
<b>II. Le contrôle du développement et de l'homéostasie de l'intestin grêle chez la souris</b>	<b>25</b>
<b>A. Les principales voies de signalisation impliquées dans le développement et l'homéostasie de l'intestin</b>	<b>25</b>
1. Voie Wnt/ $\beta$ -caténine (Figure 5A)	26
2. Voie Notch (Figure 5B)	28
3. Voie BMP (Figure 6A)	28
4. Voie Hedgehog (Figure 6B)	28
<b>B. Statique du compartiment des cryptes intestinales</b>	<b>30</b>
1. Prolifération des progéniteurs	30
a) Implication de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine	30
b) Rôle des gènes cibles de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine	31
2. Détermination de la destinée cellulaire	33
a) Les gènes cibles de la voie Notch	33
b) Détermination des lignées épithéliales	35
c) Effet d'inhibition latérale	37
<b>C. Dynamique du compartiment des cryptes intestinales</b>	<b>37</b>
1. La niche des cellules souches épithéliales	37
a) Hedgehog et la délimitation des cryptes et des villosités	38
b) BMP inhibe la formation des cryptes en empêchant l'activation de $\beta$ -caténine	39
c) Modèle général du fonctionnement de la niche épithéliale	40
2. Migration des cellules hors des cryptes	42
<b>D. Dérèglement du compartiment des cryptes intestinales</b>	<b>43</b>
1. Le cancer colorectal	43
2. Cellules souches cancéreuses	44
3. Prolifération incontrôlée	44
4. Pathologies hyperprolifératives chez l'homme	46

<b>Deuxième partie : LES HORMONES THYROÏDIENNES</b>	<b>48</b>
<b>III. Les hormones thyroïdiennes et leurs récepteurs</b>	<b>48</b>
<b>A. Synthèse des hormones thyroïdiennes</b>	<b>48</b>
<b>B. Les TR, récepteurs nucléaires aux hormones thyroïdiennes</b>	<b>48</b>
1. La famille des récepteurs nucléaires	50
2. Les gènes codant les récepteurs aux HT	50
3. Les différents domaines des TR et leurs fonctions	52
4. Mode d'action des TR	52
a) Les éléments de réponse aux hormones thyroïdiennes	52
b) Régulation transcriptionnelle par les TR	53
<b>C. Rôle des hormones thyroïdiennes et des TR</b>	<b>56</b>
1. TR et développement	56
2. TR et vie post-natale	56
<b>IV. Fonctions des hormones thyroïdiennes dans le développement intestinal des amphibiens</b>	<b>57</b>
<b>A. Les TR dans la métamorphose</b>	<b>57</b>
<b>B. Le cas particulier de l'intestin</b>	<b>58</b>
1. Implication des TR dans le remodelage de l'épithélium	58
a) TR $\beta$	58
b) TR $\alpha$	59
2. Les HT et la niche épithéliale	59
a) Le remodelage de la matrice extracellulaire (ECM)	59
b) Rôles de l'expression de Shh et BMP4	60
c) Modèle général de l'action des HT sur le développement de l'épithélium adulte au cours de la métamorphose	62
d) Comparaison souris/xénope	64
<b>V. Les hormones thyroïdiennes dans le développement intestinal chez la souris</b>	<b>65</b>
<b>A. Les TR dans l'intestin</b>	<b>65</b>
1. Développement précoce	65
2. Développement postnatal	65
<b>B. TR<math>\alpha</math> et la maturation de l'intestin au sevrage</b>	<b>66</b>
<b>C. TR<math>\alpha</math>1 et la prolifération des cellules des cryptes intestinales</b>	<b>67</b>
<b>D. Les HT et les pathologies cancéreuses</b>	<b>69</b>
<b>RESULTATS</b>	<b>71</b>
<b>I. Premier article:</b>	<b>72</b>
<i>The TR<math>\alpha</math> gene encoding the thyroid hormone receptor TR<math>\alpha</math>1 controls DNA-damage induced tissue repair</i>	72
<b>II. Deuxième article :</b>	<b>75</b>
<i>Comparative transcription profile of intestine epithelial progenitors reveals a complex interplay between the Thyroid hormone Receptor TR<math>\alpha</math>1 and the Wnt/<math>\beta</math>-catenin pathway</i>	75
<b>III. Troisième article :</b>	<b>79</b>
<i>The overexpression of the Thyroid hormone Receptor TR<math>\alpha</math>1 in the mouse intestinal epithelium is associated with hyperplasia and abnormal epithelial architecture</i>	79



<b><i>DISCUSSION et PERSPECTIVES</i></b>	<b>84</b>
<b><i>I. La voie des hormones thyroïdiennes : un régulateur majeur de la voie Wnt/<math>\beta</math>-caténine dans l'épithélium intestinal</i></b>	<b>85</b>
A. Le contrôle de l'expression de la $\beta$ -caténine	85
B. Le contrôle de l'activation de la $\beta$ -caténine	86
C. Les autres partenaires à étudier	88
<b><i>II. La voie des hormones thyroïdiennes : un acteur majeur de l'homéostasie épithéliale</i></b>	<b>88</b>
A. La régénération de l'épithélium	88
B. La prolifération de l'épithélium	89
C. Les HT, les TR et les cancers intestinaux	90
<b><i>Bibliographie</i></b>	<b>92</b>

# Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Michèle Kedinger et Laurent Sachs pour avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse malgré leurs charges. Merci également à Béatrice Desvergne et Ioan Negrutiu qui ont accepté de faire partie du jury en tant qu'examinateurs.

Merci à Michela Plateroti et à Jacques Samarut qui ont accepté ma candidature à travailler avec eux dans l'urgence. Je les remercie ici de la confiance qu'ils ont eue en mon parcours et mes capacités.

Merci à Madeleine Duc Dodon et Louis Gazzolo, qui m'ont encadrée pendant mon DEA. Lorsque je me suis trouvée sans bourse de thèse à l'issue du DEA, ils m'ont encouragée et soutenue puis finalement conseillé de répondre à l'annonce de Michela et Jacques. Ils ne pouvaient en effet pas me garantir que j'aurais une bourse dans leur laboratoire, malgré les efforts qu'ils étaient prêts à déployer pour que nous continuions à travailler ensemble. Pour avoir eu cette honnêteté, je ne les remercierai jamais assez.

Merci à Michela qui a été une directrice de thèse parfaite et grâce à qui les quatre années que j'ai passées dans l'équipe ne seront que bons souvenirs. En écoutant mes proches qui sont passés par là, je mesure à quel point j'ai eu de la chance!

Merci à Julien Nadjar. Sans son aide technique si précieuse, je n'aurais probablement pas été en mesure de présenter trois articles dans cette thèse ! Merci à lui pour sa bonne humeur constante, son amitié et sa disponibilité sans faille!

Merci à mes collègues de travail directs :

Amélie, la deuxième thésarde débauchée du laboratoire de Virologie par Michela, qui a la main si verte pour les cultures primaires ; merci à elle pour le soutien dans les moments difficiles et les pauses thèse-café toujours bienvenues ;

Sébastien, à qui je dois le plus grand service qui soit, si l'on peut parler de service! Pour les pauses thé, les parties de roller au Parc de la tête d'or, les discussions sans fin.

Merci aux autres membres de l'équipe Oncogénèse et Développement :

Anne-Marie, pour sa gentillesse et sa disponibilité, pour nous avoir permis de passer des vacances très agréables dans sa maison en Provence ;

Dogus pour les pauses café, pour son humour bien à lui

Fabrice et Romain, le boys band du labo...

Laurence, ma voisine de paillasse pour sa franchise et son humour

Et tous les autres, Maia, Anne, Karine, Sandrine, Violaine et tous ceux que j'oublie....

Merci à mes copines de déjeuner, Laure, Sana, Ingrid et Sophie. Les pauses de midi ont toujours été des vrais moments de détente avec elles. Je n'oublie pas Julien, seul garçon au milieu de toutes ces filles !

Un immense merci à Nadine Aguilera qui a géré mes 6 lignées de souris avec une patience infinie. Sans elle, tout aurait été plus compliqué ! Merci à Damien bien que ses conseils ne m'aient pas beaucoup aidée à génotyper mes souris, mais ce n'était pas de sa

faute ! C'était toujours un plaisir d'aller papoter avec lui... Merci à tout le personnel du PBES, Djamel, Farida, Christelle, Pierre, Marie, Jean-François, Jean-Louis...

Merci à Stéphanie, Marina et Laurence du service gestion, qui ont toujours passé le plus rapidement possible et avec le sourire les commandes urgentes que je leur apportais...

Merci à Clémence, ma sœur également biologiste, qui a accepté de relire mon introduction malgré son allergie pour les voies de signalisation comportant plus de deux partenaires...

Merci à mes parents qui ont été à l'écoute pendant les moments de doute.

Et enfin, merci à Dom. Il a supporté avec le sourire les horaires aléatoires, les baisses de moral et tous les aléas de la vie avec une thésarde... Sans son aide, le moment de la rédaction aurait été une épreuve...

## Abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique  
AF : Activating function  
AMPc : Adenosine monophosphate cyclique  
APC : Adenomatous polyposis coli  
bHLH : basic Helix Loop Helix  
BMP : Bone morphogenetic protein  
BMPR : Bone morphogenetic protein receptor  
CBP : CREB binding protein  
ccnd1 : Gène de la Cycline D1  
CK1 $\gamma$  : Caseine kinase 1  
CREB : cAMP-response element-binding protein  
CSL : CBF1, Su(H) et LAG1  
ctnnb1 : Gène de la  $\beta$ -caténine  
DBD : DNA binding domain  
Dkk: Dickkopf  
DR4 : Direct repeat  
DRIP/TRAP : Vitamin D receptor interacting protein/TR associated protein  
Dvl : Dishevelled  
E : Embryonnaire  
ECM : Extra-cellular Matrix  
ELF3 : E74-like factor  
Fu : Fused  
Fzd : Frizzled  
Gli: Glioblastoma  
GSK3 $\beta$  : Glycogen synthase kinase 3 beta  
HBD : Hormone binding domain  
HDAC : Histone deacetylase  
H&E: Hématoxyline et éosine  
Hes : Hairy enhancer of split  
Hh : Hedgehog  
Hhip : Hedgehog interacting protein  
HT : Hormones Thyroïdiennes  
Ihh : Indian hedgehog  
ISEMF : Intestinal sub-epithelial fibroblast  
kDA: kilo Daltons  
KLF : Kruppel-like factor  
KO : Knock out  
Lef : Lymphoid enhancing factor  
LRP : Low-density lipoprotein receptor-related protein  
math1 : Mouse atonal homologue 1  
MEB: Microscopie électronique à balayage  
MMP : Matrix metalloproteinase  
Msi1 : Musashi 1  
NCoR : Nuclear co-repressor  
NICD : Notch intracellular domain  
NLS : Nuclear localization signal  
PKA : Protein kinase A  
PN : Post natal

Ptc : Patched  
PTEN : Phosphatase and tensin homologue  
REG: Reticulum endoplasmique rugueux  
sFRP : secreted Frizzled-related protein  
Shh : Sonic hedgehog  
Smo : Smoothed  
SMRT : Silencing mediator for retinoic acid receptor and TR  
SRC: Steroid receptor co-activator  
ST3 : Stromelysine 3  
Su(fu) : Suppressor of fused  
TACE : TNF- $\alpha$  converting enzyme  
Tcf : T-cell factor  
TF: Transcription factor  
TR : Thyroid hormones receptors  
TRE : Thyroid hormone responsive element  
TRS : Thyrothropin releasing hormone  
TSH : Thyrothropin stimulating hormone  
WT: Wild type  
 $\beta$ -TCRP :  $\beta$  -transducin repeat-containing protein

# **INTRODUCTION**

# Première partie : L'INTESTIN

Dans cette première partie, je vais présenter des données concernant la souris et le xénope. Je ferai dans la deuxième partie une comparaison entre les deux systèmes, afin de mettre en lumière les points communs et les différences. De plus, dans la mesure où la plupart des mécanismes de régulation de l'homéostasie de l'épithélium intestinal ont été élucidés dans l'intestin grêle, j'ai fait le choix de ne pas parler ici du colon.

## I. Développement et maturation de l'intestin

### *A. L'intestin grêle chez la souris*

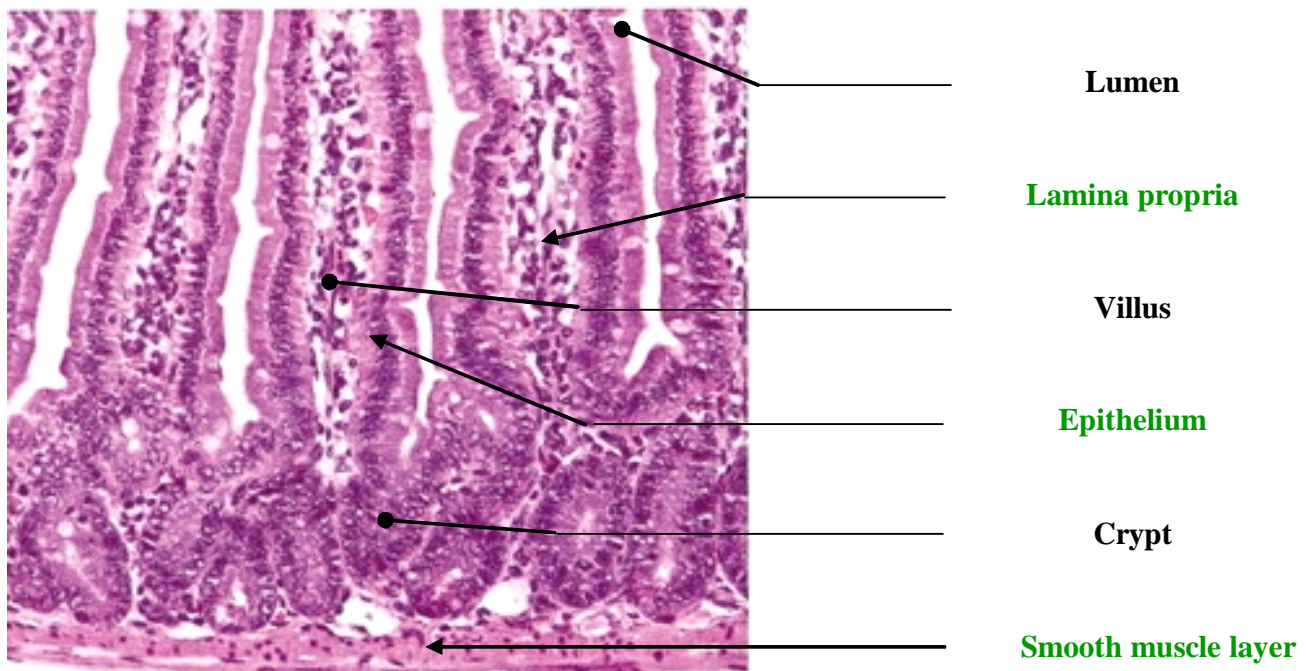
Le but de ce premier chapitre est de présenter les caractéristiques de la muqueuse intestinale, sa structure, ses fonctions, les différentes cellules qui la composent. Les mécanismes moléculaires et cellulaires de régulation du développement et de l'homéostasie de l'épithélium seront abordés dans les chapitres suivants.

#### 1. Le tube digestif

##### a) Structure de l'intestin adulte

L'intestin est un tube constitué par la muqueuse intestinale. La figure 1 présente une photo d'une coloration hématoxyline et éosine d'une coupe transversale d'intestin grêle de souris adulte. Je vais commencer cette introduction en expliquant, dans les grandes lignes, les caractéristiques générales de cette muqueuse et des différents tissus qui la composent.

- **Le lumen** : dans la mesure où le tube digestif est ouvert aux deux extrémités, la lumière (ou lumen) est considérée comme milieu extérieur. On y trouve le bol alimentaire, ainsi qu'une flore bactérienne commensale constituées de 100 à 400 espèces selon les individus. Cette flore sert à dégrader des substances



**Figure 1: La muqueuse intestinale de la souris adulte**

Coloration hématoxyline et Eosine d'une coupe transversale en paraffine d'un intestin de souris adulte WT. Grossissement: 20x

Origine de la photo: [Pinto & al., Genes & Development. 2003;17:1709-1713.](#)



que le système digestif seul est incapable de digérer et joue également un rôle protecteur contre les organismes pathogènes (O'Hara and Shanahan 2006).

- **L'épithélium** : il constitue une barrière cellulaire étanche au milieu extérieur du lumen. Il repose sur une membrane basale composée d'une lame basale d'origine épithéliale et conjonctive (Simon-Assmann et al. 1995). Les cellules épithéliales intestinales sont pour la plupart prismatiques, c'est-à-dire plus hautes que larges. Elles sont jointives et solidaires les unes des autres grâce à des jonctions serrées. L'épithélium intestinal est constitué de deux compartiments et de 4 cytotypes différenciés ainsi que de cellules souches, mais je détaillerai cela plus loin. Il est monostratifié à l'âge adulte (Dale 1998).
- **Les villosités** : les villosités sont des protrusions en forme de doigts de gants de la muqueuse intestinale dans le lumen. Elles permettent d'augmenter considérablement la surface d'absorption de l'épithélium intestinal. Elles ne sont constituées que de cellules ayant accompli leur différenciation terminale (Dale 1998). Les cellules meurent par apoptose au bout de quelques jours et sont exfoliées à l'apex des villosités.
- **Les cryptes de Lieberkühn** : ce sont des invaginations de l'épithélium dans la muqueuse intestinale. Elles contiennent les cellules souches adultes ainsi que les progéniteurs épithéliaux en cours de prolifération, de différenciation et de migration (Crosnier et al. 2006).
- **La lamina propria** : elle est composée de tissu conjonctif, de fibroblastes, de vaisseaux sanguins et lymphatiques, de cellules immunitaires, de nerfs entériques et de fibres de muscle lisse (Hauck et al. 2005). Elle constitue un support pour l'épithélium ainsi qu'une source de facteurs régulateurs, comme nous le verrons plus loin (Leedham et al. 2005).

- **Les couches musculaires lisses** : elles se divisent en une couche circulaire interne et une couche longitudinale externe. Elles sont responsables du péristaltisme et leur contraction est régulée par le système nerveux parasympathique.

## b) Développement du tube digestif

Les trois feuillets embryonnaires (endoderme, mésoderme et ectoderme) se forment lors de la gastrulation (Rubin 2007). Dans l'intestin, l'épithélium a une origine endodermique alors que le muscle lisse et le tissu conjonctif dérivent du mésoderme (Rubin 2007). La formation du tube digestif commence par une invagination de l'endoderme au pôle antérieur de l'embryon au jour E8, suivie par une invagination au pôle postérieur. Ces deux repliements migrent l'un vers l'autre jusqu'à ce qu'ils se rencontrent au niveau du nombril. Suite à ces mouvements morphogénétiques, les cellules de l'endoderme antérieur et postérieur forment la partie ventrale du tube digestif. La partie dorsale provient de l'endoderme de la ligne médiane (Grapin-Botton and Melton 2000). Le mésoderme splanchnique est lui à l'origine du tissu conjonctif et du muscle lisse (Hauck et al. 2005).

A 9 jours de vie embryonnaire, le tube digestif est formé et régionalisé de manière antéro-postérieure, dorso-ventrale et gauche-droite (de Santa Barbara et al. 2003). La différenciation antéro-postérieure de l'endoderme génère trois régions différentes dans le tube digestif (antérieure, médiane et postérieure). De nombreux organes bourgeonnent à partir de ce tube principal, y compris des organes non digestifs (thyroïde, thymus, poumons et vessie). La différenciation des différents organes issus de l'endoderme est contrôlée par de nombreux facteurs, que j'ai choisi de ne pas détailler ici.

## **2. L'intestin juvénile**

Une fois l'endoderme mis en place, il est constitué tout le long du tube digestif de cellules stratifiées, non-différenciées et en prolifération (de Santa Barbara et al. 2003). Entre E14,5 et E18,5, l'endoderme du futur intestin passe de cet état indifférencié et pluristratifié à un épithélium simple. L'apparition des villosités se fait conjointement, grâce à un remodelage du mésenchyme (Hauck et al. 2005). La prolifération est alors restreinte aux zones inter-villositaires et les cellules différenciées apparaissent dans les villosités. Ce n'est que durant les deux premières semaines après la naissance que les cryptes intestinales se forment par une invagination de l'épithélium dans le mésenchyme sous-jacent (Crosnier et al. 2006). Le processus mécanique de l'invagination est assez mal connu mais une hypothèse serait qu'il est facilité par l'action contractile des myofibroblastes subépithéliaux péricryptaux (ISEMFs) (Powell et al. 1999).

## **3. L'intestin adulte, structure et fonction**

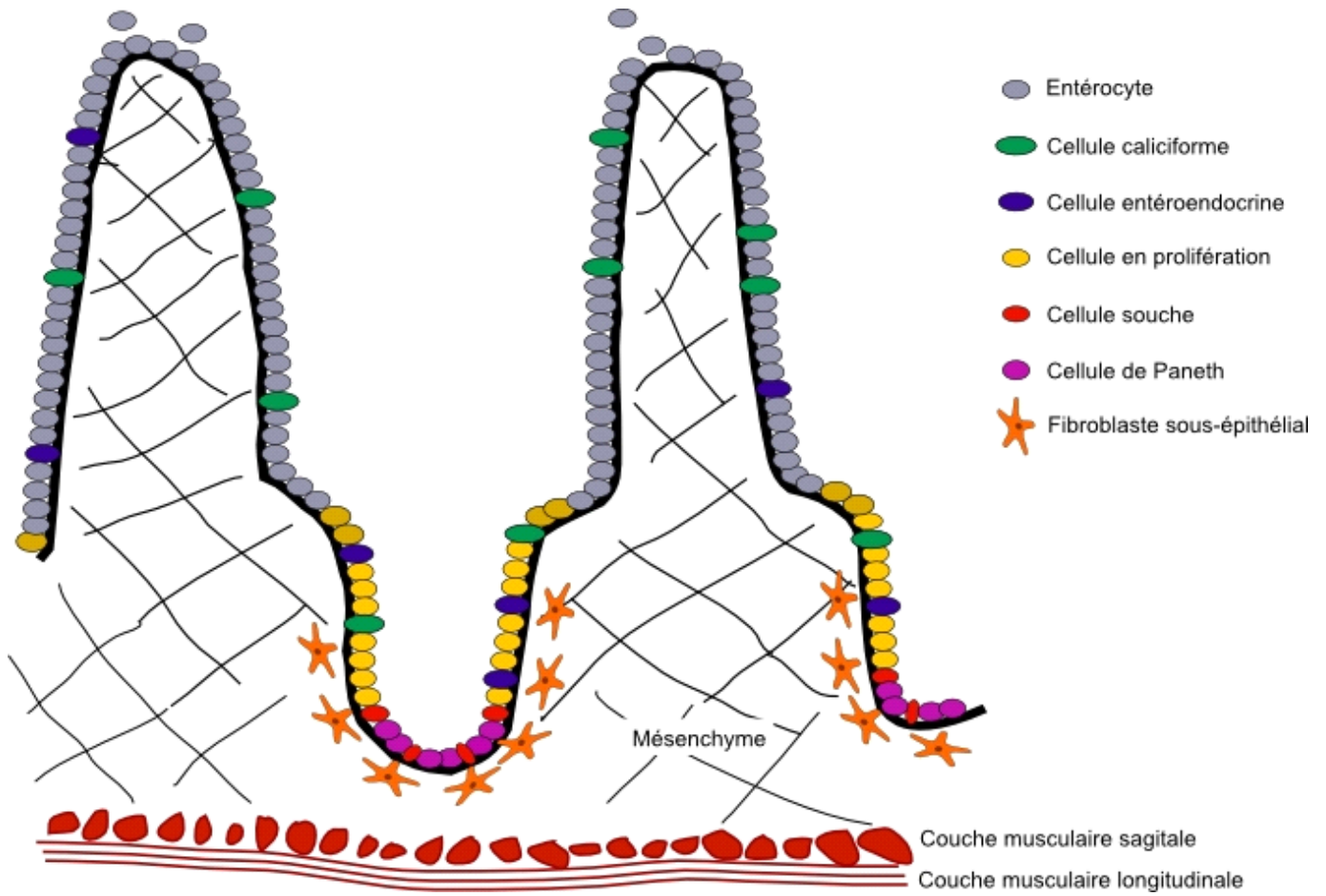
La figure 2 présente un schéma de la muqueuse intestinale. Il va me servir de base pour décrire les structures et les fonctions d'un intestin grêle adulte.

### **a) Les cytotypes de l'épithélium intestinal**

L'intestin adulte mature est composé de 4 cytotypes différenciés, dont je vais détailler la fonction.

#### Les entérocytes :

Ils ont une fonction absorbante. Ce sont les cellules les plus abondantes de l'épithélium, dans la mesure où ils représentent plus de 80% des cellules de l'axe crypte-villosité (Karam 1999). Ils sont localisés entre le sommet des cryptes et le haut des villosités (en gris sur la figure 2). Ils se différencient des autres cytotypes par l'absence de granules sécrétoires (Figure 3A), et



**Figure 2: Représentation schématique d'une coupe d'intestin grêle de souris adulte indiquant la localisation des différents cytotypes de l'épithélium**

la présence d'une bordure en brosse apicale composée de nombreuses microvillosités et de glycoprotéines. La durée de vie des entérocytes est d'environ 3 jours (Karam 1999).

#### Les cellules entéro-endocrines :

Elles secrètent des peptides et des hormones dans la lumière de l'intestin. Elles représentent 0,5% des cellules de l'axe crypto-villositaire, et sont plus nombreuses dans les cryptes que dans les villosités (en bleu sur la figure 2). Elles sont caractérisées par un grand nombre de granules de sécrétion (Figure 3B). Leur durée de vie est estimée à 4 jours dans l'intestin grêle (Karam 1999).

#### Les cellules caliciformes :

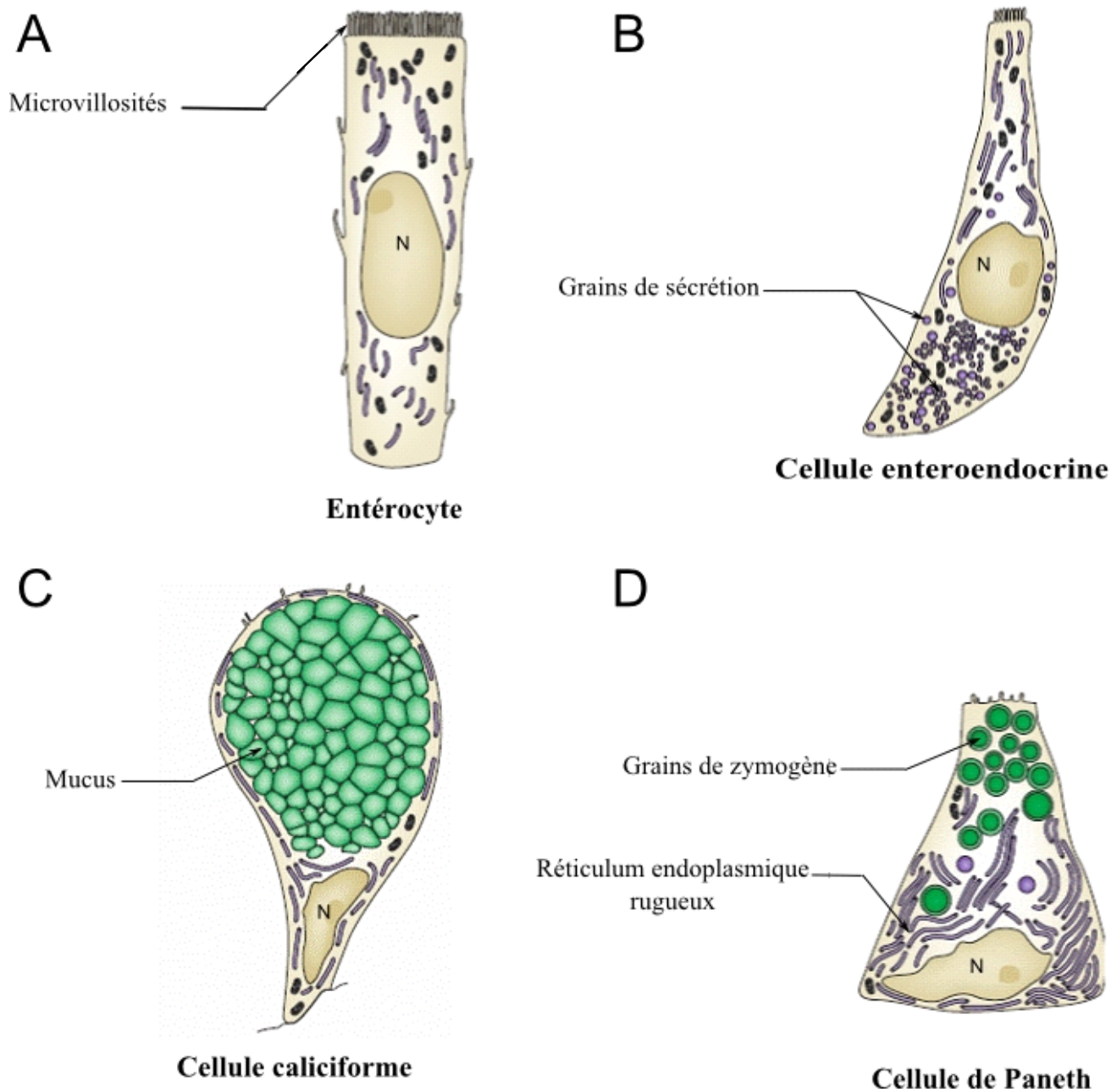
Elles sont aussi appelées cellules à mucus dans la mesure où elles secrètent le mucus qui va protéger la surface de l'épithélium intestinal. Leur proportion augmente le long de l'axe proximo-distal : elles représentent 6% des cellules épithéliales dans le jéjunum proximal et 12% dans l'iléon distal. Elles sont caractérisées par la présence de larges granules à mucus dans le cytoplasme, granules qui relèguent le noyau à la base de la cellule (Figure 3C). Leur durée de vie est d'environ 3 jours (Karam 1999).

#### Les cellules de Paneth :

Elles secrètent des molécules antimicrobiennes qui protègent la muqueuse intestinale des microorganismes pathogènes. Ce sont les seules cellules différenciées que l'on trouve dans les cryptes intestinales (en violet sur la figure 2), où elles représentent 7% des cellules. Les cellules de Paneth sont caractérisées par des granules sécrétoires apicaux, alors que le cytoplasme basal présente un RER très développé (Figure 3D). Elles ont une durée de vie de 15 jours (Karam 1999).

### **b) Les cryptes intestinales**

Comme nous l'avons vu dans le paragraphe précédent, les cellules différenciées de l'épithélium intestinal ont une durée de vie courte. Le maintien de la structure et de la



**Figure 3: Les différents cytotypes de l'épithélium intestinal chez la souris adulte**

Origine des dessins: Crosnier & al, Nature Reviews Genetics. 2006;7:349-359

fonction de cet épithélium nécessite donc un mécanisme autorisant le renouvellement continu des cellules épithéliales. Ce mécanisme a lieu dans les cryptes intestinales (Stappenbeck et al. 1998). Elles contiennent des cellules souches adultes, dont je parlerai juste après, et des progéniteurs prolifératifs (en jaune sur la figure 2). Ces progéniteurs se divisent dans les cryptes et se différencient en migrant, de telle sorte que les cellules qui en sortent ont atteint leur différenciation terminale (Crosnier et al. 2006). On estime qu'une cellule subit de 4 à 6 divisions cellulaires avant de migrer hors de la crypte (Bach et al. 2000).

L'utilisation de souris mosaïques a permis de montrer qu'initialement les zones prolifératives inter-villositaires, et les cryptes naissantes sont polyclonales, mais que lors des deux premières semaines post-natales, une purification des cryptes a lieu afin qu'elles deviennent monoclonales (Schmidt et al. 1988). Ceci implique que toutes les cellules d'une unité crypte/villosité sont issues d'une même cellule originelle.

D'un point de vue tridimensionnel, les cryptes intestinales sont des structures épithéliales en forme de tube à essais contenant environ 250 cellules, d'une circonférence de 16 cellules à l'épaisseur maximale et de 25 cellules de hauteur. Les positions les plus basses sont occupées par une trentaine de cellules de Paneth. Les 150 cellules au-dessus sont en prolifération et se divisent environ deux fois par jour chez la souris (Potten and Loeffler 1990).

### c) Les cellules souches de l'épithélium intestinal

Le compartiment des cryptes contient les cellules en prolifération. Cette réserve de cellules en prolifération est continuellement renouvelée grâce à la présence de cellules souches (Bach et al. 2000).

Il n'existe pas de critères morphologiques permettant d'identifier les cellules souches parmi les cellules des cryptes intestinales. En 1990, Potten et Loeffler ont proposé une liste

des propriétés que doivent avoir les cellules souches adultes, liste qui est désormais acceptée par les spécialistes du sujet (Potten and Loeffler 1990).

#### 1. Prolifération lente:

Parmi les 150 cellules en prolifération présentes dans les cryptes, une petite proportion située vers la base de la crypte a un cycle cellulaire de 24 heures, contre 12 heures pour les autres (Potten et al. 1990).

#### 2. Auto-renouvellement :

Afin de maintenir un nombre constant de cellules souches par cryptes, leur division doit être strictement contrôlée. Il existe plusieurs hypothèses concernant cette division, mais la plus communément admise est que chaque cellule souche subit une division asymétrique et donne naissance à une cellule souche et une cellule engagée de manière irréversible vers la différenciation terminale. Cette hypothèse est encore impossible à tester à l'heure actuelle. Cependant, Potten et son équipe ont montré en 2002, grâce à des expériences de marquage à la thymidine tritiée, que les cellules souches intestinales gardaient toujours le brin d'ADN matrice lors de la division cellulaire, assurant ainsi l'intégrité de leur génome (Potten et al. 2002). Ces données vont dans le sens d'une division asymétrique des cellules souches.

#### 3. Pluripotence :

Des expériences d'irradiation ont montré qu'une seule cellule souche survivante pouvait régénérer l'épithélium intestinal avec les 4 cytotypes (Withers and Elkind 1970). Les cellules souches de l'épithélium intestinal sont donc bien pluripotentes.

#### 4. Régénération de l'épithélium:

Nous avons vu dans la paragraphe I.A.3.(b) que les deux tiers des cryptes sont composés de cellules en prolifération et engagées vers la différenciation. Lors d'une irradiation, les cellules en prolifération meurent par apoptose suite aux dommages à l'ADN (Potten and Booth 1997). Les cellules des villosités ne sont donc plus renouvelées correctement et les villosités se raccourcissent. Dans le cryptes, une cellule souche non-



endommagée initie le processus de régénération et l'épithélium intestinal est à nouveau fonctionnel au bout de quelques jours (Potten and Booth 1997).

A partir de ces critères, les cellules souches intestinales (en rouge sur la figure 2) ont été identifiées comme étant entre les cellules de Paneth et les progéniteurs en prolifération rapide (Potten and Loeffler 1990). A l'heure actuelle, une protéine de fixation à l'ARN, Musashi1 (Msi1) est considérée par les spécialistes du domaine comme étant un marqueur moléculaire des cellules souches (Kayahara et al. 2003). Des marquages de l'ARNm et de la protéine Msi1 ont confirmé la position des cellules souches intestinales (Potten et al. 2003).

Très récemment, Barker et collaborateur ont mis en évidence un marqueur des cellules souches, le gène *lgr5*, codant la protéine Gpr49 (Barker et al. 2007). Grâce à l'analyse de souris exprimant le gène de la  $\beta$ -galactosidase inséré en aval du promoteur de *lgr5*, ils ont montré que les cellules exprimant *Lgr5* étaient les cellules souches de l'épithélium intestinal. Elles ont en effet la capacité de générer tous les cytotypes épithéliaux en 60 jours. Ces données vont à l'encontre de l'hypothèse précédente (cellules souches entre les cellules de Paneth et les progéniteurs prolifératifs), mais l'on peut émettre l'hypothèse qu'il y ait deux réservoirs distincts des cellules souches intestinales, chacun ayant une fonction spécifique.

Dans la mesure où chaque cellule souche peut générer jusqu'à 128 cellules épithéliales (Bach et al. 2000), il est évident que le compartiment des cellules souches doit être strictement régulé afin de garantir l'homéostasie du tissu. Le contrôle des cellules souches se fait grâce à un compartiment appelé « niche », qui procure et maintient le microenvironnement cellulaire et moléculaire nécessaire au bon fonctionnement de ces cellules (Brittan and Wright 2002). Nous verrons en détail quels sont les mécanismes de cette régulation dans le deuxième chapitre.

## **B. Métamorphose de l'intestin chez le xénope**

Avant la métamorphose, l'intestin du xénope est un tube digestif simple adapté à une alimentation herbivore. La métamorphose permet à la grenouille de s'adapter à une alimentation carnivore.

### **1. La métamorphose, principes généraux**

Les amphibiens de l'ordre des anoures, auquel appartient l'espèce modèle *Xenopus laevis*, ont un développement en deux étapes : des œufs éclosent des larves aquatiques herbivores pourvues de branchies et dépourvues de pattes, les têtards ; les adultes sont des animaux carnivores semi-aquatiques munis de pattes postérieures puissantes adaptées au saut. Le passage du têtard à la grenouille nécessite un remodelage drastique des structures et fonctions des différents organes. Il est possible de distinguer trois phénomènes (Furrow and Neff 2006) :

1. Mort par apoptose et disparition des tissus utilisés uniquement chez le têtard (*eg* : branchies, queue) ;
2. Génération *de novo* d'organes adultes (*eg* : membres, mâchoires) ;
3. Remodelage de tissus pour une adaptation à la vie adulte (*eg* : intestin, peau).

Nous verrons dans la deuxième partie que la métamorphose est strictement dépendante des hormones thyroïdiennes.

### **2. La métamorphose de l'intestin**

#### **a) Structure de l'intestin du têtard**

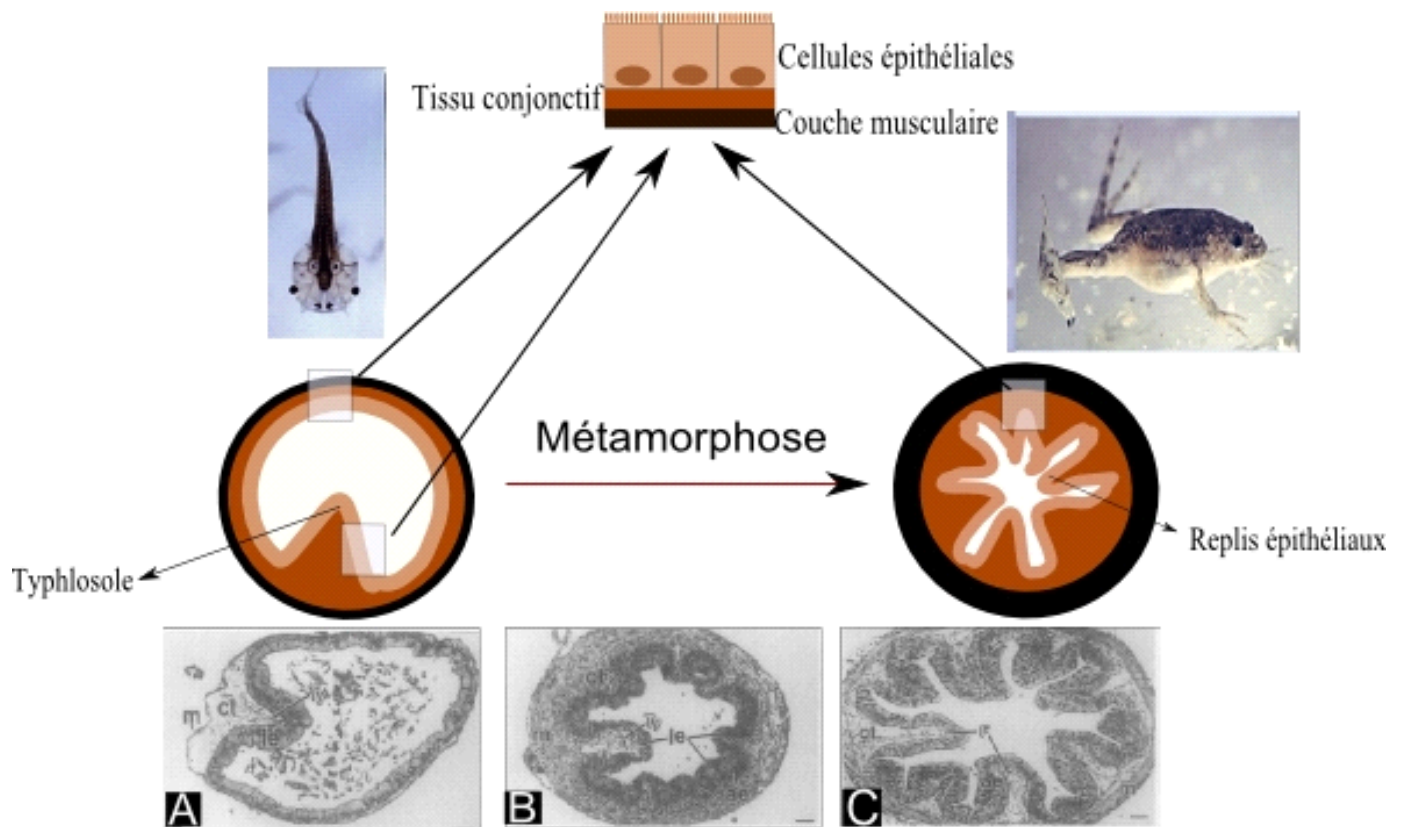
Comme nous l'avons vu dans la première partie, l'intestin des vertébrés est composé de plusieurs tissus. Initialement, chez le xénope, l'endoderme est constitué d'une masse compacte de cellules. Ces cellules prolifèrent et se différencient en une mono-couche de

cellules épithéliales associées à du tissu conjonctif d'origine mésodermique (Shi and Ishizuya-Oka 2001). Contrairement à la souris, l'épithélium du têtard ne présente pas de villosités mais une involution unique dans le premier tiers de l'intestin grêle, le typhlosole (Figure 4A). L'épithélium est entouré de tissu conjonctif ainsi que de deux couches musculaires, l'une interne et radiale, l'autre externe et longitudinale (Figure 4) (Brown and Cai 2007). De plus, les cellules épithéliales capables de proliférer sont réparties aléatoirement dans le typhlosole (Ishizuya-Oka and Shi 2005), ce qui est une différence majeure avec les vertébrés supérieurs.

### b) Les remodelages durant la métamorphose

Le remodelage de l'intestin commence au début du point culminant de la métamorphose (environ une semaine après éclosion), par une apoptose massive des cellules épithéliales (Shi and Ishizuya-Oka 2001). L'intestin est alors raccourci de 75% et est temporairement sous la forme d'une couche multicellulaire (Brown and Cai 2007). De façon concomitante à l'apoptose des cellules épithéliales larvaires, des cellules épithéliales adultes apparaissent dans des ilots à l'interface entre l'épithélium et le tissu conjonctif (Figure 4, panneau B) (Shi and Ishizuya-Oka 2001). L'épithélium adulte prolifère activement et se différencie pour remplacer l'épithélium larvaire dégénérescent. Par la suite, l'épithélium forme des replis, les cellules épithéliales se différencient, et l'intestin présente une structure assez proche de celle des vertébrés supérieurs (Figure 4, panneau C) (Ishizuya-Oka and Shi 2005). La couche musculaire est bien développée, l'épithélium forme des replis et les cellules en prolifération sont localisées dans le creux entre chaque repli. L'épithélium intestinal se renouvelle alors en continu comme celui de la souris (Shi and Ishizuya-Oka 2001).

Conjointement à la transition de l'épithélium, le tissu conjonctif se remodèle. La prolifération des différents types cellulaires qui le composent augmente et, par conséquent, le nombre de cellules et l'épaisseur augmentent également (Shi and Ishizuya-Oka 2001). Le



**Figure 4: Modifications structurales de l'intestin au cours de la métamorphose chez l'amphibien**

**Origine des photos:**

têtard et grenouille juvénile: <http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/xenope1/le%20têtard/têtard2.htm>

Coloration Hématoxyline d'intestins : Yun-bo Shi & Atsuko Ishizuya-Oka, Prog Nucleic Acid Res Mol Biol. 2001;65:53-100.

changement le plus drastique est celui de la lame basale qui s'épaissit fortement. Elle devient paradoxalement plus perméable, notamment aux macrophages qui participent à la résorption de l'épithélium larvaire. Il y a également plus de contacts entre les primordia de cellules épithéliales adultes et les fibroblastes du tissu conjonctif à travers cette lame basale modifiée (Ishizuya-Oka and Shi 2005). Les conséquences de ces contacts seront expliquées dans la deuxième partie.

### c) Les progéniteurs épithéliaux chez le xénope

La question de l'origine des cellules épithéliales adultes qui apparaissent dans les primordia durant la métamorphose est très débattue. Deux hypothèses principales sont envisagées. La première est que les cellules épithéliales adultes émergent d'une population prédéterminée contenant également les cellules souches épithéliales (Ishizuya-Oka et al. 2003); la seconde est que les cellules épithéliales du têtard sont les précurseurs des cellules épithéliales adultes (Schreiber et al. 2005).

Ishizuya-Oka et ses collaborateurs avancent pour preuve de la première hypothèse le fait que les cellules épithéliales adultes émergentes expriment *Msi1*, et que cette expression diminue très fortement une fois la métamorphose accomplie. Ils avancent l'hypothèse que les cellules des creux entre les replis épithéliaux doivent être *Msi1* positives, mais que l'expression n'est pas détectée pour des raisons techniques (Ishizuya-Oka et al. 2003).

Schreiber et ses collaborateurs ont également réalisé un marquage de *Msi1* par hybridation *in situ*. Ils observent la présence de l'ARNm *Msi1* dans tout l'épithélium au cours des différentes phases de la métamorphose, et concluent que ce n'est pas un marqueur spécifique des cellules souches adultes. Le fait que les cellules épithéliales prolifèrent dans tous l'épithélium dès le début de la métamorphose les amène à conclure que les cellules épithéliales adultes émergent des cellules épithéliales larvaires différenciées (Schreiber et al. 2005).

La limite de l'étude de Schreiber est qu'ils n'ont pas analysé l'expression de la protéine, contrairement à Ishizuya-Oka. Nous verrons dans la deuxième partie, concernant la régulation par les hormones thyroïdiennes, que l'hypothèse de Ishizuya-Oka me paraît plus soutenue par les données expérimentales. Cependant, les deux hypothèses aboutissent au fait que des progéniteurs prolifératifs doivent émerger d'un épithélium différencié et non-prolifératif. Ce phénomène implique forcément une étape de « dé-différenciation », pour laquelle l'environnement (tissu conjonctif, matrice extracellulaire etc.) des cellules épithéliales serait fondamental. On retrouve ici le concept de « niche » présent également chez la souris. Je reviendrais sur cet aspect de la biologie de l'intestin des amphibiens dans la deuxième partie de cette introduction.

## **II. Le contrôle du développement et de l'homéostasie de l'intestin grêle chez la souris**

La régulation du développement et de l'homéostasie de l'épithélium intestinal est extrêmement complexe. Elle implique de nombreuses voies de signalisation et des processus très variés. Afin de rester claire dans mon propos, j'ai choisi d'utiliser deux approches pour faire une synthèse des connaissances sur la physiologie des cryptes intestinales : l'une statique et l'autre dynamique. Le côté statique présentera les différents processus « à plat », avec les partenaires moléculaires et les mécanismes impliqués alors que le côté dynamique sera plus proche de la réalité de la physiologie des cryptes intestinales.

### ***A. Les principales voies de signalisation impliquées dans le développement et l'homéostasie de l'intestin***

Afin de simplifier l'analyse des phénomènes qui régissent l'homéostasie de l'épithélium intestinal, j'ai choisi de commencer ce chapitre par une brève présentation des

différents partenaires des voies de signalisation qui sont en jeu. Ce résumé sera de toute façon très simplifié et vous pourrez voir par la suite que ces différentes voies de signalisation ne sont pas cloisonnées et interagissent à plusieurs niveaux.

Afin de ne pas surcharger le texte, les abréviations sont explicitées uniquement en annexe.

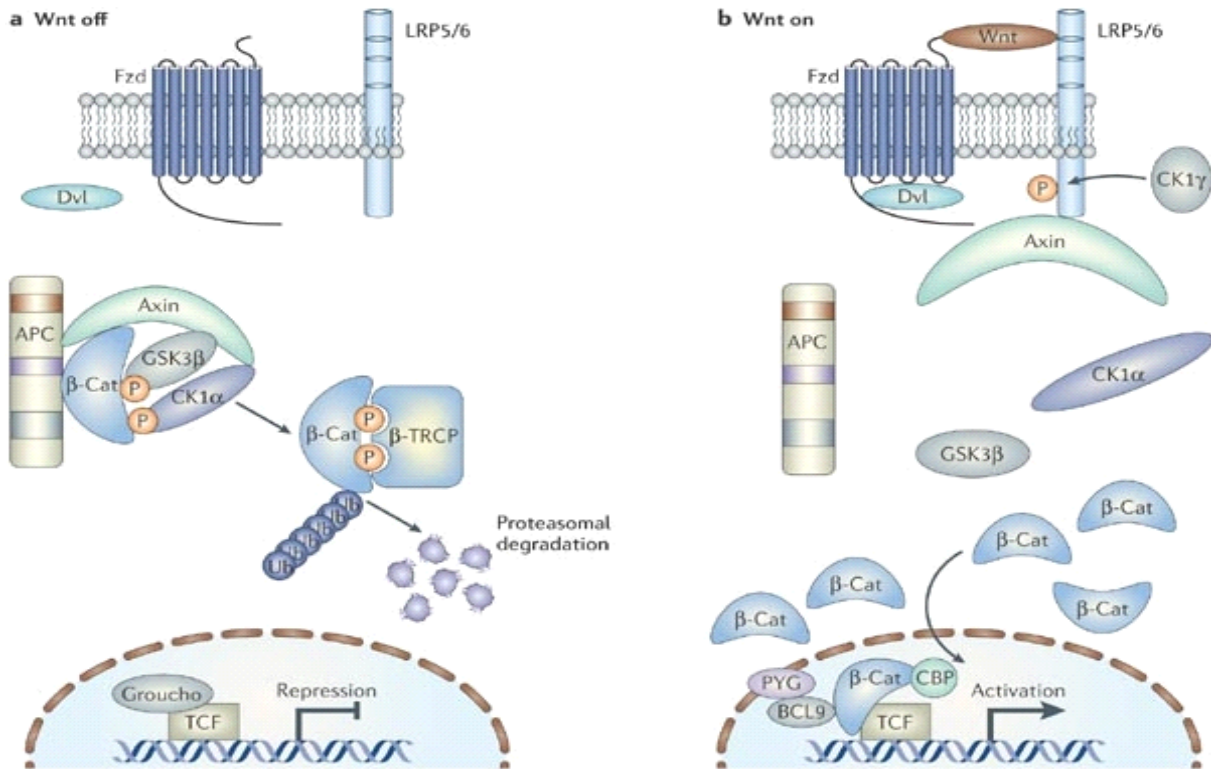
## **1. Voie Wnt/ $\beta$ -caténine (Figure 5A)**

Lorsque le signal Wnt est absent (Figure 5Aa), la  $\beta$ -caténine est capturée par dans le complexe de destruction constitué par APC et axine. Cela facilite sa phosphorylation par les kinases CK1 $\gamma$  et GSK3 $\beta$ , qui phosphorylent de manière séquentielle des résidus sérine et thréonine à l'extrémité animo-terminale de la  $\beta$ -caténine. Ces phosphorylation permettent la fixation de  $\beta$ -TRCP, qui ubiquitinye la  $\beta$ -caténine et assure ainsi sa dégradation par le protéasome. Du fait de l'absence de  $\beta$ -caténine dans le noyau, les facteurs de transcription Tcf/Lef recrutent des co-répresseurs comme Groucho et inhibent la transcription des gènes cibles (Barker and Clevers 2006; Cadigan and Liu 2006).

Le facteur Wnt interagit avec un complexe récepteur (figure 5Ab) constitué de Fzd et LRP. Le complexe ainsi formé permet la formation d'un second complexe entre Fzd et Dvl, qui va être phosphorylé par CK1 $\gamma$ . L'axine est alors relocalisée à la membrane, ce qui inactive le complexe de destruction de la  $\beta$ -caténine. Celle-ci pénètre alors dans le noyau et interagit avec Tcf (et notamment Tcf4) pour recruter de nombreux co-activateurs. La transcription des gènes cibles est alors activée. Ces gènes cibles, comme *c-myc* ou *ccnd1* (Cycline D1), agissent sur le cycle cellulaire (Dale 1998; Moon et al. 2004).

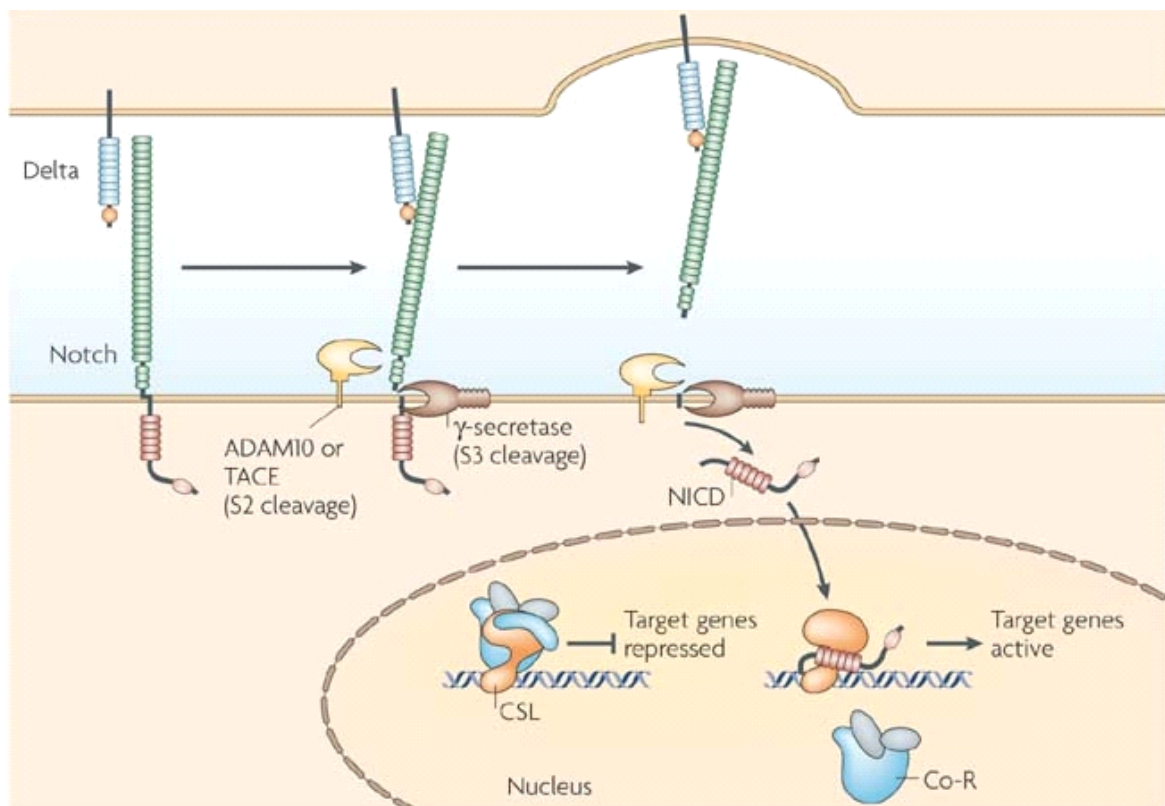
Il existe des molécules inhibitrices de la voie Wnt, comme les sFRP ou Dkk. Les sFRP sont des protéines sécrétées qui ont une structure proche de Fzd, et qui peuvent donc séquestrer le signal Wnt (Gregorieff and Clevers 2005). Dkk se fixe au LRP et empêche la signalisation Wnt de se faire correctement.

## A – La voie Wnt/ $\beta$ -caténine



Braker & Clevers, Nature Reviews Drug discoveries. 2006; 5(12):997-1014

## B – La voie Notch



Thurston & al., Nature Reviews in Genetics. 2007; 7(5):327-331

**Figure 5: Les voies de signalisation Wnt et Notch**



## **2. Voie Notch (Figure 5B)**

L'une des particularités de la voie Notch est que le ligand n'est pas sécrété mais fixé à la membrane de la cellule qui apporte le signal. Lorsque le récepteur Notch s'est lié à son ligand, il subit une série de clivages protéolytiques, d'abord par ADAM10 ou TACE et ensuite par la  $\gamma$ -secrétase. Il est à noter que le schéma présenté le ligand Delta mais il en existe d'autres. Le domaine intracellulaire de Notch, ou NICD, est transféré dans le noyau, où il interagit avec la famille des facteurs de transcription CSL et active la transcription de gènes cibles comme *hes1* (Thurston et al. 2007).

## **3. Voie BMP (Figure 6A)**

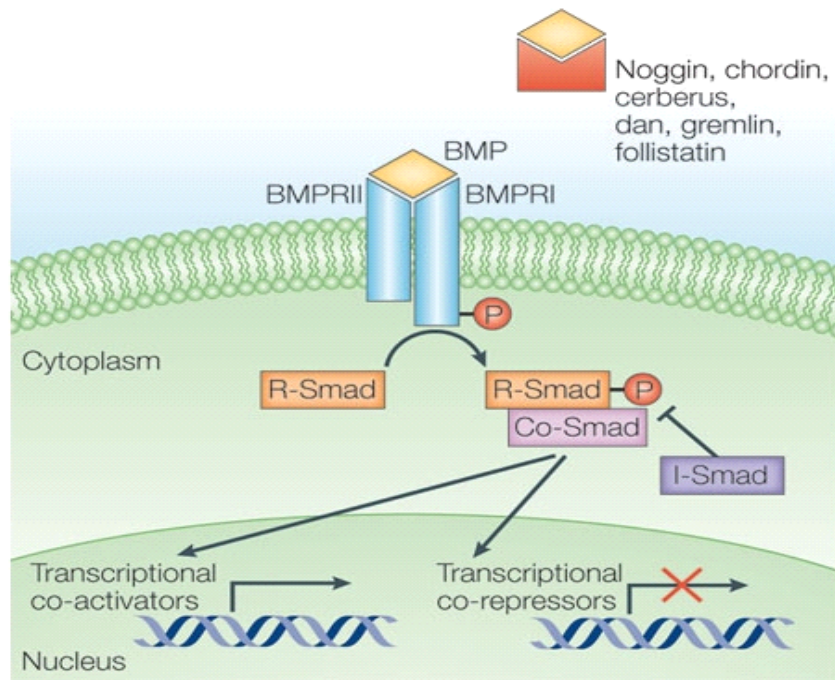
Les ligands BMP se lient aux récepteurs BMPRI et BMPRII. BMPRII phosphoryle et active BMPRI qui, à son tour, phosphoryle les protéines Smads. Les Smads activées s'associent avec un co-médiateur co-Smad qui facilite le transfert dans le noyau et la régulation des gènes cibles. Les Smads peuvent interagir avec des co-activateurs ou des co-répresseurs et moduler ainsi la réponse transcriptionnelle de la cellule qui a reçu le signal BMP (Liu and Niswander 2005).

Les inhibiteurs de la voie sont principalement Noggin, un antagoniste extracellulaire qui capture les ligands BMP, et I-Smad, un inhibiteur intracellulaire qui empêche l'interaction R-Smads/Co-Smads (Liu and Niswander 2005).

## **4. Voie Hedgehog (Figure 6B)**

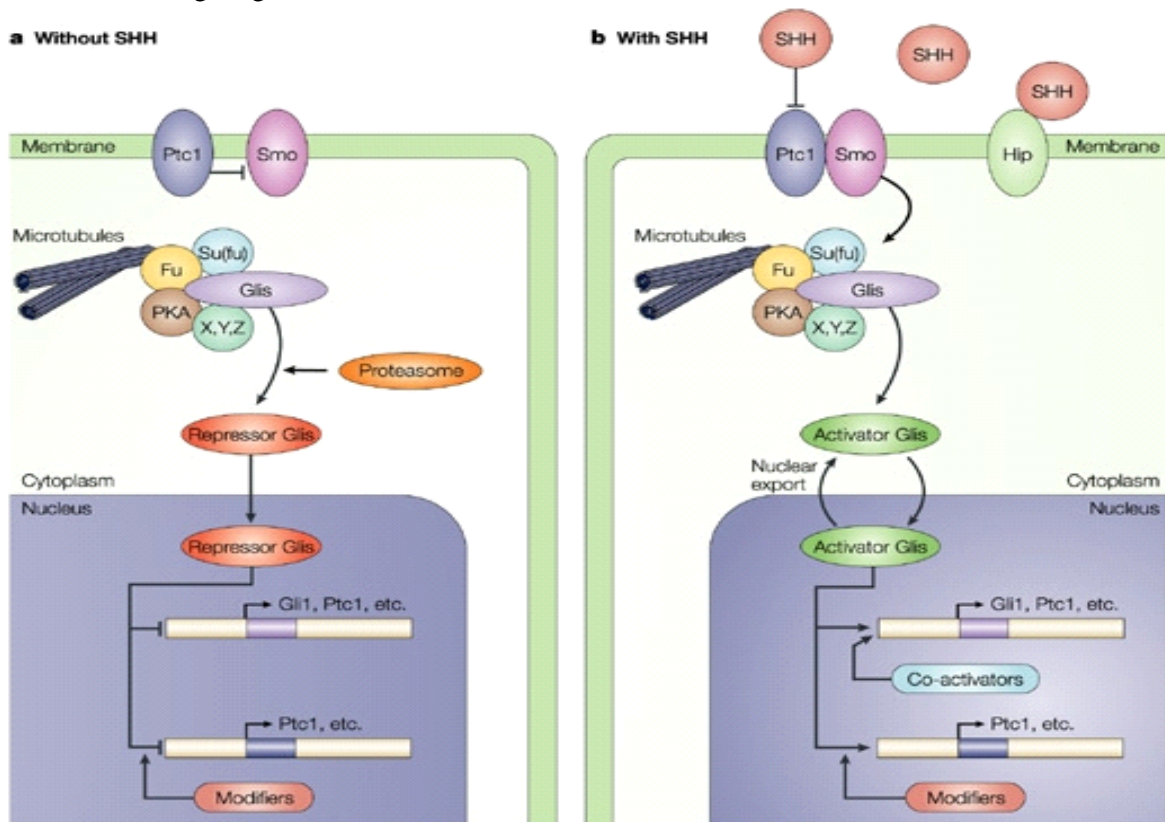
En l'absence de Hh (Sonic ou Indian Hedgehog), le récepteur Ptc1 inhibe Smo et toute la cascade intracellulaire. Les protéines Gli sont phosphorylées par PKA et dégradées par le protéasome, ce qui aboutit à la formation d'un répresseur Gli tronqué, qui va dans le noyau réprimer la transcription des gènes cibles. Lorsque Shh se fixe au complexe Ptc/Smo, il se

## A – La voie BMP



Liu & al., Nature Reviews in Neuroscience. 2005 Dec; 6(12):945-54.

## B – La voie Hedgehog



Ruiz i Altaba & al., Nature Reviews in Neuroscience. 2002 Jan; 2(01):24-33.

**Figure 6: Les voies de signalisation BMP et Hedgehog**

forme un complexe macromoléculaire qui s'associe au cytosquelette et inclus Su(fu), Fu, PKA et les Gli et produit des protéines Gli activatrices. Celles-ci sont importées dans le noyau et transactivent des gènes cibles (Ruiz i Altaba et al. 2002).

La régulation de l'activité des Gli se fait à plusieurs niveaux : export nucléaire, cofacteurs activateurs ou répresseurs. L'inhibition peut également se faire par Hhip, un facteur membranaire qui piège Shh et l'empêche d'activer la voie (Ruiz i Altaba et al. 2002).

## ***B. Statique du compartiment des cryptes intestinales***

Le schéma de la figure 7 synthétise les données présentées dans ce paragraphe.

### **1. Prolifération des progéniteurs**

#### **a) Implication de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine**

La voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine a été l'une des premières décrites dans le contrôle de la prolifération des cellules des cryptes intestinales. L'effecteur intracellulaire de cette voie, la  $\beta$ -caténine, est présent dans les noyaux des cellules à la base des cryptes, mais décroît alors que les cellules migrent au sommet de la crypte (van de Wetering et al. 2002). La voie Wnt/ $\beta$ -caténine est donc active dans les cellules souches et les progéniteurs prolifératifs. Elle est également active dans les cellules de Paneth mais j'y reviendrai plus tard. L'étude de souris transgéniques ou KO (knock out) pour les différents partenaires de la voie a permis d'affiner la compréhension de son rôle dans la prolifération intestinale (Nakamura et al. 2007).

Afin d'étudier le rôle physiologique de Tcf4 dans les cryptes intestinales, Korinek et collaborateurs ont généré un modèle de souris KO pour le gène *tcf712* (qui code le facteur Tcf4) (Korinek et al. 1998). Ces souris meurent peu après la naissance d'un défaut de l'intestin. Celui-ci ne présente en effet que des cellules différenciées et pas de compartiment prolifératif. L'épithélium intestinal n'a donc ni cellules souches, ni progéniteurs épithéliaux.

Cette étude a été une des premières à mettre en lumière de rôle de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine dans le maintien des cellules souches et des progéniteurs.

Etant donnée l'importance de l'implication de la  $\beta$ -caténine dans le développement précoce, il est impossible d'étudier l'effet d'une invalidation constitutive du gène *ctnnb1* (Haegel et al. 1995). En 1998, l'équipe de Gordon a généré une souris mutante qui exprime une protéine  $\beta$ -caténine tronquée dans l'épithélium intestinal (Wong et al. 1998b). Cette  $\beta$ -caténine est plus stable que la protéine sauvage et mime l'effet d'une activation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine. Chez les souris mutantes de 6 mois, les proportions des différents cytotypes sont normales, mais le taux de prolifération dans les cryptes est quatre fois supérieur à celui des souris WT. Par la suite, une ablation conditionnelle du gène *ctnnb1* a mis en évidence le phénotype inverse, c'est-à-dire une réduction et une disparition des cryptes n'exprimant pas *ctnnb1* (Ireland et al. 2004). Ces études montrent que la  $\beta$ -caténine et son partenaire Tcf4 sont impliqués dans la prolifération, mais ne mettent pas clairement en jeu une intervention des signaux Wnt en eux-mêmes.

Pour éclaircir ce point, Clevers et ses collaborateurs ont élaboré une stratégie de transgénèse permettant de bloquer les interactions Wnt/Fzd/LRP en surexprimant Dkk1 dans l'épithélium intestinal (Pinto et al. 2003). Les souris transgéniques présentent des villosités très courtes, les cryptes sont réduites à quelques structures résiduelles et seules quelques unes contiennent des cellules en prolifération. L'analyse de la  $\beta$ -caténine montre qu'elle ne se transfère pas dans le noyau des souris transgéniques. L'une des cibles de  $\beta$ -caténine, *c-myc*, est également absente. Cette étude montre que la prolifération des cellules des cryptes intestinales dépend de l'activation de la voie Wnt canonique.

## b) Rôle des gènes cibles de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine

L'effet de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine sur la prolifération de l'épithélium intestinal se fait grâce aux gènes cibles de  $\beta$ -caténine/Tcf. J'ai choisi ici de ne détailler le rôle d'un des gènes

cibles, qui est également un acteur majeur du cycle cellulaire : *c-myc* (He et al. 1998; Shtutman et al. 1999).

#### c-Myc :

Après l'identification de *c-myc* comme gène cible de  $\beta$ -caténine, il a fallu comprendre comment ce gène intervenait dans la régulation de la prolifération épithéliale.

Le gène *c-myc* code un facteur de transcription qui peut activer ou réprimer l'expression de gènes cibles (Bettess et al. 2005). Les souris *c-myc* KO meurent durant la gestation à cause de l'absence de cellules hématopoïétiques (Davis et al. 1993), donc une approche d'inactivation conditionnelle était nécessaire (Bettess et al. 2005). Les auteurs ont d'abord induit l'inactivation de *c-myc* à P7, puis prélevé l'intestin 21 jours plus tard. Les analyses menées sur coupes ne montrent aucun défaut de prolifération, ni de différenciation. Les auteurs ont refait les mêmes analyses en prélevant les intestins tous les deux jours après inactivation du gène. Les souris euthanasiées entre 4 et 8 jours ont moins de cryptes que les souris WT. Les auteurs expliquent la différence entre le phénotype adulte et le phénotype précoce par le fait que les cellules épithéliales prolifèrent plus lors de la formation des cryptes, et donc qu'à ce moment-là elles souffrent plus de l'absence de *c-myc*. Cette absence doit être compensée par d'autres membres de la famille Myc dans l'intestin adulte.

Une autre équipe a réalisé un autre KO conditionnel de *c-myc*, en utilisant un système de recombinaison différent (Muncan et al. 2006). Leur étude montre que les cryptes *c-myc* KO sont remplacées par des cryptes exprimant *c-myc*, par un mécanisme évoquant la régénération du compartiment prolifératif après un dommage à l'ADN. Par ailleurs, si la prolifération n'est pas affectée, comme l'a montré le papier précédent, le nombre de cellules par crypte est réduit, les cellules sont plus petites et la cinétique du cycle cellulaire est réduite. De ce fait, la lenteur de renouvellement des cryptes *c-myc* KO déclenche une réponse régénérative chez les cryptes normales.

Le rôle de c-Myc dans les cryptes intestinales n'est pas seulement d'activer le cycle cellulaire des progéniteurs prolifératifs, mais également d'empêcher l'entrée de ces cellules en stade G0. En effet, c-Myc réprime directement l'expression de *p21<sup>CIP1/WAF1</sup>*, un inhibiteur du cycle cellulaire impliqué dans la différenciation terminale (van de Wetering et al. 2002). L'homéostasie du compartiment prolifératif est donc dépendant d'une balance entre prolifération et différenciation, et c-Myc est un régulateur clé de ce cet équilibre (Pinto et al. 2003).

#### Les autres gènes cibles :

L'un des gènes cible souvent utilisé comme marqueur de l'activation de la  $\beta$ -caténine est *ccnd1*. Cependant, le rôle de la cycline D1 dans la prolifération de l'épithélium intestinal est moins connu, du fait de la difficulté d'analyser l'effet d'un gène appartenant à une famille aussi redondante que celle des cyclines D (Gregorieff and Clevers 2005). Les souris invalidées pour *ccnd1* ne présentent aucune anomalie de l'intestin (Hulit et al. 2004).

La table 1 présente une liste non exhaustive des gènes cibles de  $\beta$ -caténine/Tcf (Gregorieff and Clevers 2005).

## **2. Détermination de la destinée cellulaire**

### **a) Les gènes cibles de la voie Notch**

Nous avons vu dans le premier chapitre que l'épithélium est composé de deux types de cellules différenciées : les cellules absorbantes et les cellules sécrétrices. Ces cellules émergent des cellules souches intestinales, mais doivent séparer leurs destinées précocement.

L'implication de la voie Notch dans le développement des fonctions endocrines du pancréas et du système nerveux a été une piste pour analyser son rôle dans l'épithélium intestinal (Fre et al. 2005). La transcription du gène *hes1* est régulée directement par Notch (Figure 5B). Hes1 est un facteur bHLH (basic Helix Loop Helix) qui agit comme un

Gene	Type	LOF/GOF	References
c-Myc	-bHLH transcription factor	-knockdown blocks proliferation	He et al. 1998; van de Wetering et al. 2002
Cyclin D1	-cell cycle regulator	-cyclinD1 <sup>-/-</sup> /APC <sup>min/+</sup> show reduced polyp burden	Shtutman et al. 1999; Tetsu and McCormick 1999; Hult et al. 2004
Id2	-inhibitor of bHLH transcription factors	-Id2 <sup>-/-</sup> develop tumors and show impaired differentiation	Rockman et al. 2001; Russell et al. 2004
ITF-2	-bHLH transcription factor	-overexpression promotes neoplastic transformation	Kolligs et al. 2002
Tcf1	-Wnt signaling	-Tcf1 <sup>-/-</sup> /APC <sup>min/+</sup> show increased polyp burden	Roose et al. 1999
PPARδ	-ligand-activated transcription factors	-PPARδ <sup>-/-</sup> /APC <sup>min/+</sup> show increased polyp burden -treatment with PPARδ agonist, GW501516, increases number and size of polyps in APC <sup>min/+</sup>	He et al. 1999; Gupta et al. 2004; Harman et al. 2004; Reed et al. 2004
COX-2	-prostaglandin pathway	-COX-2 <sup>-/-</sup> /APC <sup>Δ716/+</sup> show reduced polyp burden	Oshima et al. 1996; Hsi et al. 1999; Araki et al. 2003
HDAC2	-histone deacetylase	-treatment with HDAC2 inhibitor, valproic acid, reduces polyp number in APC <sup>min/+</sup> mice	Zhu et al. 2004
FGF18	-growth factor	-knockdown suppresses growth of CRC cells	Shimokawa et al. 2003
FGF20	-growth factor	-knockdown suppresses anchorage-independent growth	Chamorro et al. 2005
Endothelin	-growth factor	-rescues growth arrest and apoptosis resulting from blocking β-catenin	Kim et al. 2005
Gastrin	-gastrointestinal growth factor and hormone	-Gastrin <sup>-/-</sup> /APC <sup>min/+</sup> show reduced polyp burden	Koh et al. 2000
BAMBI	-BMP and activin membrane-bound inhibitor	-overexpression blocks TGFβ-mediated growth inhibition	Sekiya et al. 2004
MMP7/Matrilysin	-ECM protease	-MMP7 <sup>-/-</sup> /APC <sup>min/+</sup> show reduced polyp burden	Wilson et al. 1997
Nr-CAM	-adhesion	-overexpression increases cellular motility	Conacci-Sorrell et al. 2002
Mdr1	-ABC transporter	-Mdr1 <sup>-/-</sup> /APC <sup>min/+</sup> show reduced polyp burden	Yamada et al. 2000, 2003
ENC1	-BTB/Kelch protein family member	-overexpression increases growth rate in CRC cells	Fujita et al. 2001
APCDD1	-unknown	-knockdown inhibits cell/tumor growth	Takahashi et al. 2002

**Table 1: Liste des gènes cibles de β-caténine/Tcf**

Ce tableau présente les gènes cibles de la voie Wnt canonique dont la fonction est connue, indiquant la modification (gain ou perte de fonction) et le phénotype intestinal, ainsi que les références bibliographiques correspondantes.

**Origine du tableau :** Gregorieff & Clevers, *Genes & Development*. 2005; 19:877-890

répresseur transcriptionnel des facteurs bHLH (Sasai et al. 1992). Les souris *hes1* KO présentent une létalité embryonnaire (Jensen et al. 2000). L'analyse du phénotype intestinal des embryons a montré que ces souris ont un nombre anormal de cellules endocrines, caliciformes et des cellules de Paneth. Par ailleurs, *Hes1* régule négativement la transcription du gène *math1* (mouse atonal homologue 1) (Nakamura et al. 2007). Les analyses menées sur l'intestin des souris *math1* KO ont montré que l'épithélium était dépourvu de cellules sécrétrices (Yang et al. 2001).

Ces données ont par la suite été corroborées par l'activation conditionnelle de la voie Notch (Fre et al. 2005). Lorsque cette voie est activée grâce à l'induction de l'expression d'une forme constitutivement active de Notch, l'épithélium intestinal ne présente plus que des cellules en prolifération et aucune cellule de la lignée sécrétrice. A l'inverse, lorsque la voie Notch est bloquée par un inhibiteur de la  $\gamma$ -secrétase, les cryptes sont envahies par des cellules caliciformes (van Es et al. 2005). Elles expriment fortement *math1* mais plus du tout *Hes1*.

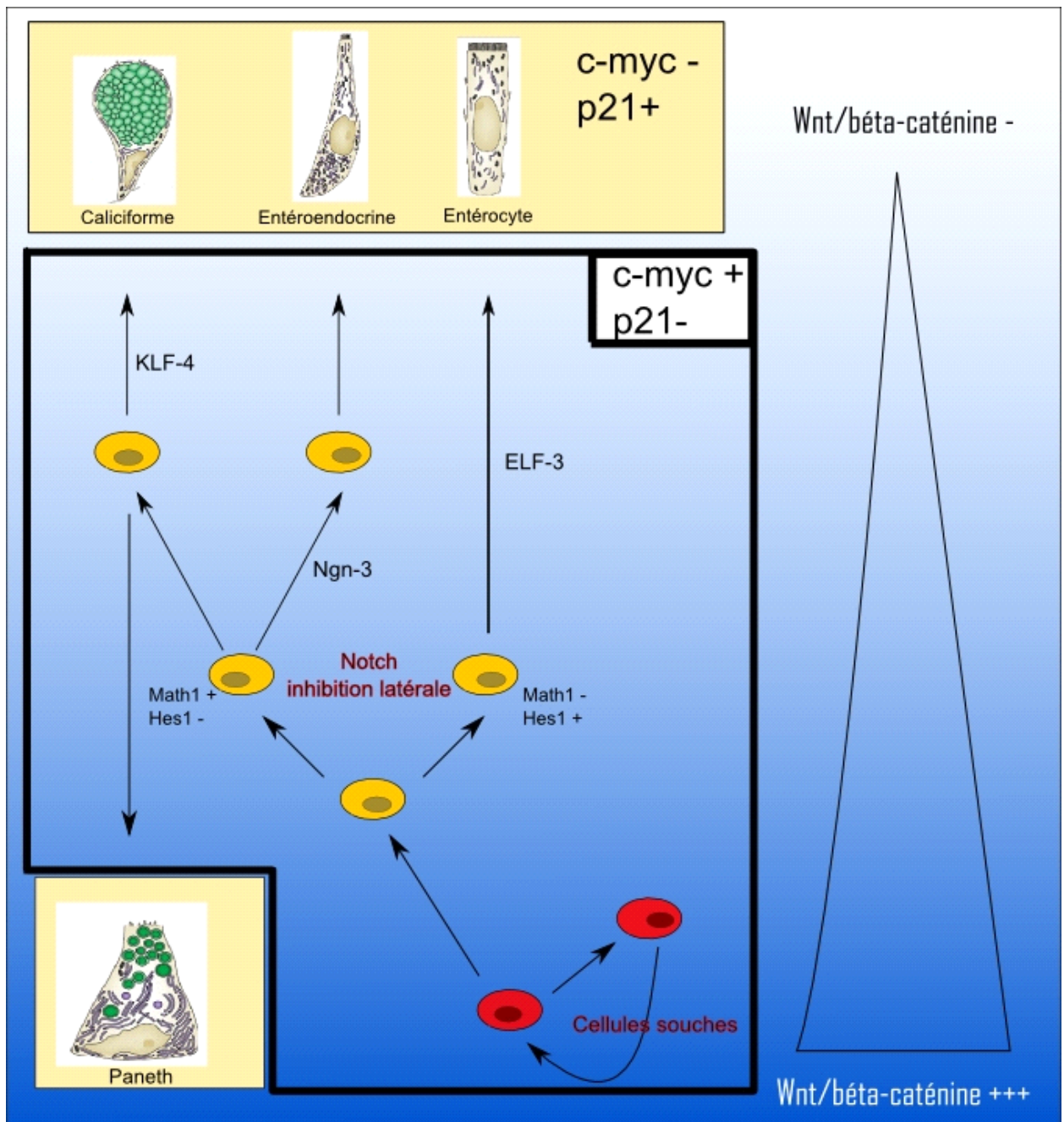
La voie Notch est donc essentielle dans le maintien des cellules souches, ainsi que dans la détermination de la destinée cellulaire.

## b) Détermination des lignées épithéliales

La destinée cellulaire des progéniteurs épithéliaux est donc déterminée par l'activation de la voie Notch. Dans une cellule où elle est active, *Hes1* est exprimé, et cette cellule devient une cellule absorbante grâce à l'inhibition de *math1*. A l'inverse, lorsque Notch est inactif, *hes1* n'est pas exprimé et *Math1* permet l'engagement vers une destinée sécrétoire (Nakamura et al. 2007). Par la suite, la différenciation dans les trois cytotypes est déterminée par d'autres gènes (Figure 7) comme Neurogénine3, KLF4 (Kruppel-like factor 4) et ELF3 (E74-like factor) (Nakamura et al. 2007) (Sancho et al. 2003).

Les cellules de Paneth sont une exception parmi les cellules différenciées dans la mesure où elles présentent une forte accumulation de la  $\beta$ -caténine nucléaire mais ne





**Figure 7: Spécification des destinées cellulaires dans la différenciation épithéliale**

Une cellule souche (en rouge) accomplit une division asymétrique. Le progéniteur prolifératif issu de cette cellule (en jaune) se divise en deux cellules filles, l'une ayant sur l'autre un effet d'inhibition latérale. La cellule exprimant Math1 s'engage vers la lignée sécrétoire alors que la cellule exprimant Hes1 s'engage vers la lignée absorbante. Différents gènes vont déterminer plus précisément la destinée cellulaire des progéniteurs. Tant que les cellules sont dans la zone d'expression de c-myc (ligne noire), elles prolifèrent. Ce n'est que lorsque p21 est exprimé que les cellules accomplissent leur différenciation terminale (cellules sur fond jaune). La  $\beta$ -caténine nucléaire est représentée par un gradient du bas vers le haut des cryptes. Elle contrôle positivement l'expression de c-myc, sauf dans les cellules de Paneth.

prolifèrent pas (Pinto et al. 2003). Elles n'expriment pas *c-myc* mais elles expriment *p21<sup>CIP1/WAF1</sup>*, ce qui explique pourquoi elles sont pleinement différenciées malgré la présence de la  $\beta$ -caténine.

### c) Effet d'inhibition latérale

Pour expliquer cette détermination différente de deux cellules adjacentes grâce à la voie Notch, il faut se référer à l'hypothèse de l'inhibition latérale (Yang et al. 2001; Hauck et al. 2005). Cette hypothèse propose qu'une cellule souche donne naissance à deux cellules filles par l'intermédiaire d'un progéniteur intermédiaire. Dans une des cellules, *math1* est exprimé, donc cette cellule est destinée à la lignée sécrétoire. Or Math1 est capable d'activer la transcription de partenaires de la voie Notch, dont des ligands Delta (Gazit et al. 2004). La cellule Math1 positive va donc présenter un ligand Delta sur sa membrane. La cellule voisine va recevoir le signal dû à la liaison Delta/Notch, ce qui va aboutir à une augmentation de Hes1, une diminution de Math1, et donc à une orientation vers la lignée entérocytaire (Figure 7). Ainsi, la cellule fille destinée à la lignée sécrétoire contrôle l'inhibition latérale de sa voisine, afin que celle-ci aille vers la lignée entérocytaire (Hauck et al. 2005; Crosnier et al. 2006).

## ***C. Dynamique du compartiment des cryptes intestinales***

Cette partie de mon introduction présente des données expliquant comment fonctionne le compartiment des cryptes c'est-à-dire comment les cellules souches sont maintenues dans leur état, comment les progéniteurs prolifératifs sont renouvelés en permanence au fil des cycles cellulaires, et comment les cellules une fois différenciées sortent des cryptes.

### **1. La niche des cellules souches épithéliales**

Une cellule souche est une cellule dangereuse de par ses capacités (décrites dans le premier chapitre). Si elle se met à proliférer de manière incontrôlée ou dans un contexte

inadapté, les conséquences sur le tissu et sur l'organisme sont extrêmement délétères. Pour que le contrôle de ces cellules soit le plus strict possible, elles doivent résider dans un environnement particulier, appelé « niche » (Mills and Gordon 2001; Leedham et al. 2005). Il s'agit d'un groupe de cellules épithéliales et mésenchymateuses, associées à des éléments de l'ECM (matrice extra cellulaire), qui créent un microenvironnement propice au maintien de l'état souche des cellules, ainsi qu'à leur division en précurseurs épithéliaux. Cette niche n'agit pas que sur les cellules souches mais également sur les progéniteurs prolifératifs et sur le devenir des cellules. Les quatre voies de signalisation présentées dans le premier paragraphe de ce chapitre interviennent dans la mise en place et la persistance de cette niche.

#### a) Hedgehog et la délimitation des cryptes et des villosités

Les membres de la famille Hedgehog exprimés dans l'intestin sont Sonic Hedgehog (Shh) et Indian Hedgehog (Ihh). Leur expression commence à E8,5, dans l'endoderme du tube digestif (Bitgood and McMahon 1995). A E18,5, *shh* est exprimé dans l'épithélium intervillitaire alors que *ihh* l'est dans tout l'épithélium (Ramalho-Santos et al. 2000). Le récepteur *ptc* et l'effecteur transcriptionnel *gli* sont eux exprimés dans le tissu conjonctif juste sous l'épithélium, ainsi que dans le tissu conjonctif intravillitaire. L'analyse des souris KO pour *ihh* et *shh* est possible juste avant la naissance, après quoi les souriceaux meurent. Les souris *ihh* KO ont des villosités très réduites, ainsi qu'une diminution de 50% de la prolifération de la zone intervillitaire, alors que les souris *shh* KO ont une occlusion duodénale due à des villosités hypertrophiées. Les deux mutants ont une réduction de 20 à 30% de la couche musculaire circulaire interne muscle.

D'autres auteurs ont construit une lignée de souris transgéniques qui surexpriment Hhip (hh interacting protein), un inhibiteur de Ihh comme de Shh, dans l'épithélium intestinal (Madison et al. 2005). Ces souris ont un épithélium quasiment plat, mais hyperprolifératif et même pseudostratifié par endroits, et surtout qui exprime des gènes cibles de la voie

Wnt/ $\beta$ -caténine. De plus, les ISEMFs (décrits dans le paragraphe I.A.2.) ne sont plus localisés à la base de l'épithélium des régions intervillositaires. On les retrouve dans les villosités, mais toujours à proximité de régions prolifératives. Ces données sont à mettre en parallèle avec le travail d'Ormestad et collaborateurs qui ont montré que les facteurs de transcription *foxf1* et *foxf2* étaient des cibles de Hh dans le tissu conjonctif (Ormestad et al. 2006). Au stade E18,5, les doubles mutants *foxf1* et *foxf2* présentent une accumulation des ISEMFs, des précurseurs épithéliaux, associée à une signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine accrue et à une absence de BMP4 dans le tissu conjonctif.

Le signal Hh partant de l'épithélium agirait donc sur le tissu conjonctif, pour restreindre les signaux de prolifération envoyés par le ISEMFs aux cellules, et permettre ainsi la différenciation des progéniteurs et donc la formation de l'axe crypte/villosité (Crosnier et al. 2006; van den Brink 2007). Il se trouve que *BMP4* est une cible de Shh dans le mésenchyme durant le développement intestinal (Roberts et al. 1998), ce qui nous amène au paragraphe suivant.

## b) BMP inhibe la formation des cryptes en empêchant l'activation de $\beta$ -caténine

La voie BMP est connue pour être perturbée dans la polypose juvénile, une pathologie intestinale humaine (Howe et al. 1998). L'expression de *BMP4* est forte dans le tissu conjonctif intravillatoire mais absente dans les fibroblastes sous-épithéliaux (Haramis et al. 2004). La présence d'une voie BMP active dans les cellules épithéliales différenciées (voir Figure 6A) est reflétée par la présence de Smad phosphorylées. Il y a donc un signal paracrine inverse au signal Hh, c'est-à-dire qui va du tissu conjonctif à l'épithélium. Les KO pour les *BMP* et leurs récepteurs étant létaux, les auteurs ont construit une lignée de souris transgéniques surexprimant l'inhibiteur de BMP Noggin. A trois semaines ces souris ont de fortes anomalies de l'architecture de l'épithélium. Les villosités présentent des invaginations perpendiculaires

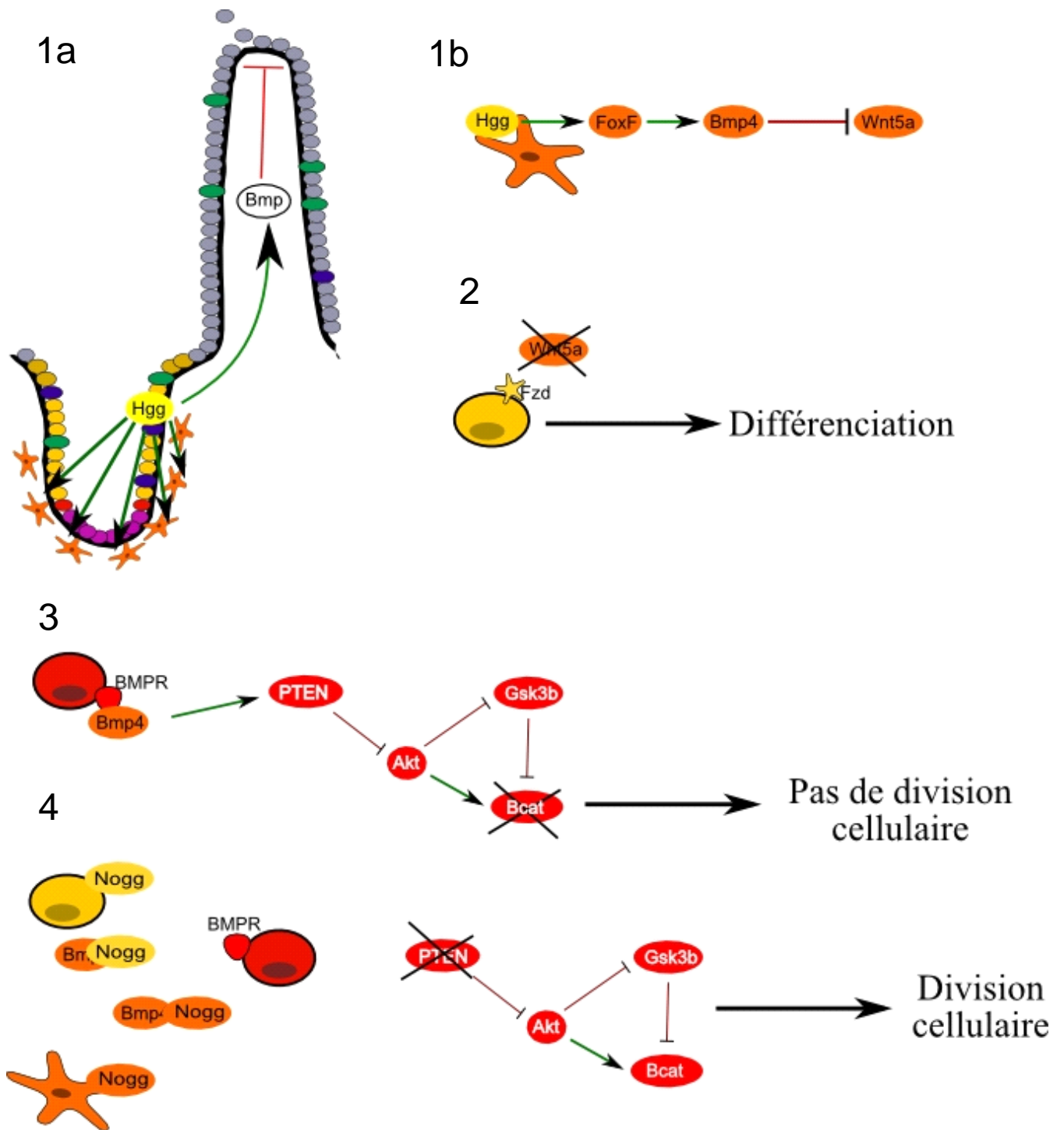
à l'axe crypte/villosité. Ces invaginations contiennent des structures prolifératives ayant toutes les caractéristiques d'une crypte, y compris la capacité de produire les quatre cytotypes différenciés. Au bout de trois mois, elles ont l'aspect caractéristique de polypes.

L'équipe de Liheng Li c'est également intéressée au rôle de la voie BMP dans le contrôle de la niche épithéliale (He et al. 2007) (He et al. 2004). Grâce à l'utilisation d'un mutant conditionnel du récepteur *BMPRIa*, ils ont pu à la fois confirmer et affiner les données de Haramis et collaborateurs. Ces souris développent également des polypes dus à la fission des cryptes intestinales. Le rôle de la voie BMP est donc d'empêcher la duplication des cellules souches, et par conséquent de réguler le nombre et la localisation des cryptes intestinales. Une cible de la voie BMP est PTEN (Phosphatase and Tensin homologue), qui inactive Akt, et donc empêche la translocation nucléaire de la  $\beta$ -caténine (Figure 8). Akt est capable à la fois d'inhiber la dégradation de la  $\beta$ -caténine en agissant sur GSK3 $\beta$ , et de phosphoryler  $\beta$ -caténine sur une sérine à l'extrémité carboxy-terminale, ce qui aboutit à sa translocation nucléaire.

### c) Modèle général du fonctionnement de la niche épithéliale

La figure 8 présente ce modèle intégrant les différentes voies de signalisation :

- **1a :** Les signaux Hh sont générés dans l'épithélium au niveau des cellules des cryptes et vont se fixer sur leur récepteur Ptc au niveau du tissu conjonctif intravillositaire pour activer la transcription de *BMP4*.
- **1b :** Ils vont également cibler les ISEMFs, où la transcription des *foxf* active celle de *BMP4*.
- **2 :** BMP4 réprime la synthèse du facteur Wnt5a, les progéniteurs épithéliaux reçoivent moins de signaux de la voie Wnt et engagent leur différenciation terminale. L'inhibition de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine passe aussi par la voie PTEN/Akt, directement dans les cellules épithéliales.



**Figure 8: Modèle de fonctionnement des cryptes intestinales**

**1a:** Inhibition de l'épithélium des villosités (en gris) par BMP; **1b:** Inhibition par la voie Hh de la synthèse de Wnt5a par les fibroblastes sous-épithéliaux (en orange); **2:** Inhibition de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine dans les progéniteurs prolifératifs (en jaune) et engagement dans la voie de différenciation; **3:** Inhibition de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine, via l'activation de PTEN par la voie BMP, dans les cellules souches épithéliales (en rouge); **4:** Inhibition de la voie BMP par Noggin, activation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine et division des cellules souches.

La couleur des protéines indique leur provenance cellulaire.

**3 :** BMPR1a est exprimé à la surface des cellules souches intestinales. BMP exprimé par les fibroblastes adjacents se fixe sur son récepteur et la cellule reste quiescente.

- **4 :** Lorsque la cellule souche doit se diviser, Noggin est exprimé par les progéniteurs voisins et les fibroblastes péricryptaux et empêche la fixation de BMP sur son récepteur. L'inhibition de la cascade présentée en 2 est levée, la  $\beta$ -caténine est transférée dans le noyau et la cellule souche se divise.

Une fois la cellule souche divisée, la voie Notch intervient pour présider à la destinée cellulaire, (Figure 7) alors que la voie Wnt/ $\beta$ -caténine active la prolifération rapide des progéniteurs épithéliaux.

Ce modèle montre bien à quel point les différentes voies de signalisation coopèrent pour permettre le contrôle de la division des cellules souches, l'approvisionnement en progéniteurs, leur prolifération, ainsi que l'engagement de ces mêmes progéniteurs dans la différenciation.

## **2. Migration des cellules hors des cryptes**

La physiologie du compartiment des cryptes implique, comme nous l'avons vu tout au long de ce chapitre, le déplacement de nombreux facteurs de contrôle de la prolifération, de l'engagement dans une destinée cellulaire etc. Les progéniteurs prolifératifs s'engagent dans la voie de différenciation au fil des divisions cellulaires mais ils doivent également devenir insensibles aux signaux pro-prolifération qui peuvent perturber leur différenciation. La migration des cellules hors des cryptes n'est pas due au fait que les nouvelles cellules les repoussent dehors, mais à un processus actif. Les acteurs de ce mécanisme sont les éphrines, dont EphrinB1 et leurs récepteurs EphB2 et EphB3. Ce sont des protéines associées à la membrane cellulaire qui ont la particularité de se repousser, créant ainsi des frontières et des

voies de migrations. Ainsi, une cellule portant EphrinB1 s'éloignera d'une cellule portant EphB2 ou EphB3 (Crosnier et al. 2006). Dans l'intestin, la voie Wnt/ $\beta$ -caténine active l'expression des récepteurs et inhibe celle de l'éphrine. Chez l'adulte, Ephrine B1 est surtout présente à la jonction crypte/villosité, alors qu'EphB2 et EphB3 sont présents à la base des cryptes. Grâce à ce mécanisme, les cellules qui ont commencé leur différenciation et sont sorties de la zone de forte prolifération commencent à exprimer Ephrine B1 et donc sont « expulsées » des cryptes intestinales (Gregorieff and Clevers 2005; Hauck et al. 2005).

## ***D. Dérèglement du compartiment des cryptes intestinales***

Jusqu'ici je n'ai pas abordé les dysfonctionnements qui peuvent se produire dans le système hyper-régulé des cryptes intestinales. J'ai fait ce choix parce qu'il me semble plus judicieux d'expliquer les événements aboutissant à une pathologie cancéreuse une fois que tous les éléments de compréhension du système ont été donnés.

### **1. Le cancer colorectal**

Le cancer colorectal est un des cancers les plus fréquents dans les pays occidentalisés. L'intestin est un organe particulièrement favorable pour l'apparition d'un cancer, dans la mesure où un nombre très élevé de divisions cellulaires y a lieu chaque jour. De plus, l'épithélium intestinal se retrouve exposé aux agents agressifs présents dans le contenu intestinal. L'analyse de modèles murins mutants ou transgéniques a permis de mieux comprendre la séquence allant du polype bénin à l'adénocarcinome potentiellement mortel.

Nous avons vu dans les chapitres précédents que l'épithélium se renouvelle continuellement. Ce renouvellement très rapide ne permet pas aux cellules différenciées d'accumuler des mutations qui leur feraient acquérir un phénotype hyper- ou néoplasique. Les erreurs doivent donc survenir au niveau de la cellule souche elle-même, ou à celui des tous



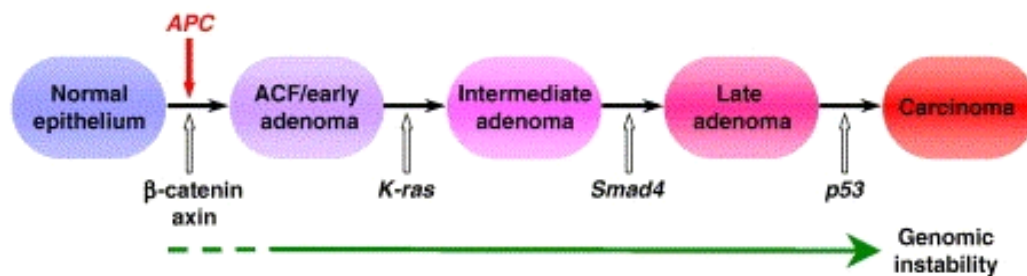
premiers progéniteurs prolifératifs. Il est admis que la carcinogénèse colorectale suit un modèle génétique précis, fait d'une suite de mutations (Figure 9).

## **2. Cellules souches cancéreuses**

La polypose intestinale est la première étape de cette suite. Elle résulte généralement d'un nombre anormal de cryptes dans l'épithélium intestinal (Pinto and Clevers 2005b; He et al. 2007). L'étude qui, à mon sens, décrit le mieux la dérégulation de l'état souche est celle de Xi He (He et al. 2007). J'ai évoqué ce travail brièvement dans le paragraphe précédent. Après avoir montré en 2004 qu'il existe un lien entre PTEN, BMP et Wnt, les auteurs se sont intéressés au suppresseur de tumeur PTEN. Ils ont construit une lignée de souris mutantes dans laquelle le gène *PTEN* peut être invalidé au moment voulu. Ces souris invalidées ont un intestin hyperplasique envahi de polypes, et les cellules souches prolifèrent plus vite que la normale. De plus, les cryptes se divisent également, par fission ainsi que par bourgeonnement, et des cellules souches se trouvent toujours au point d'initiation de la division. Leur hypothèse est que la perte de l'expression de PTEN serait un événement très précoce, qui aboutirait à une mobilité accrue des cellules souches car Akt, réprimé par PTEN en temps normal, joue un rôle dans la migration cellulaire. Les cellules souches seraient alors en trop grand nombre dans une crypte, ce qui provoque la fission des cryptes. La perte de l'expression de PTEN, peut être la cause de la mutation de gènes en amont, comme *BMP* ou *Hh*.

## **3. Prolifération incontrôlée**

Une fois que la division des cellules souches n'est plus régulée, l'étape suivante est souvent la mutation d'*APC*, l'un des membres du complexe inhibiteur de la  $\beta$ -caténine (voir figure 5A et 9), (Pinto and Clevers 2005a; Radtke and Clevers 2005), ou encore la mutation de *ctnnb1*, *GSK3 $\beta$*  ou *axin*. Ceci a pour conséquence une activation constitutive de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine et de ces gènes cibles, et donc de la prolifération cellulaire (Gregorieff and



**Figure 9: Modèle de la carcinogénèse colorectale humaine**

Des mutations dans la voie Wnt/ $\beta$ -caténine apparaissent dans l'épithélium intestinal, la prolifération est accrue, des polypes et des adénomes apparaissent; la prolifération incontrôlée crée une instabilité génomique favorisant l'apparition de mutations dans d'autres voies de signalisation (*K-ras*, BMP, *p53*), jusqu'à ce que le terrain génétique soit propice à l'apparition de carcinomes.

**Origine du schéma:** Pinto & Clevers. *Experimental Cell Research*. 2005, 306:357-363

Clevers 2005). Il a également été observé que l'activité débridée de  $\beta$ -caténine/Tcf4 exerçait une boucle de rétrocontrôle sur l'expression de partenaires de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine, comme *Tcf1* et *Lef*.

Dans la suite de la séquence, on trouve la mutation de *K-ras*. L'expression d'une protéine K-ras mutée dans l'épithélium intestinal de souris aboutit à l'apparition de lésions allant d'un nombre de cryptes trop élevé à l'adénocarcinome (Janssen et al. 2002). Le phénotype est dû à une activation trop forte de la voie des MAP kinases, qui dérégule à son tour le cycle cellulaire.

Par la suite, des mutations de la voie BMP puis de p53 engagent définitivement les cellules épithéliales vers la carcinogénèse.

#### **4. Pathologies hyperprolifératives chez l'homme**

De nombreuses pathologies de la prolifération présentes chez l'homme sont dues à des anomalies génétiques dans les différents gènes clés du contrôle des cryptes intestinales. Ceci montre que dans ce domaine les études menées chez la souris sont généralement transposables à la pathologie humaine. J'ai choisi de faire ici une liste non-exhaustive des symptômes en lien avec les différentes voies de signalisation :

- Maladie de Cowden : maladie autosomale dominante rare caractérisée par des tumeurs multiples des muqueuses et des polypes intestinaux. Cette maladie est due à une mutation de PTEN (He et al. 2007);
- Polypose juvénile : syndrome de polypose intestinale autosomal dominant ; les patients ont des mutations dans la voie BMP, soit au niveau de Smad (effecteurs de la voie), soit au niveau des récepteurs au BMP.
- Polypose adénomateuse familiale : adénomes très nombreux dans le colon ; maladie due à une mutation du gène *APC*. Le risque pour ces patients de développer un cancer au cours de leur vie est quasiment de 100%.

Avec ces exemples de maladies humaines dues à des gènes dont l'implication dans la physiologie des cryptes a été comprise grâce à des modèles murins, j'ai voulu mettre en lumière le parallèle que l'on peut faire entre l'homme et la souris. Il y a bien entendu certainement des différences dans certains mécanismes, mais les grandes voies de signalisation qui contrôlent l'homéostasie des cryptes intestinales sont les mêmes. Grâce à ce parallèle, il peut être possible d'expliquer une donnée épidémiologique assez frappante : entre 1973 et 1987, le taux de cancers de l'intestin grêle était de 0,4 pour 100 000, alors que celui de cancers du colon était de 33,7 pour 100 000. Chez la souris, il a été montré que les cellules souches étaient capables de garder le brin d'ADN matrice lors de la division cellulaire (cf. § I.A.3.(c)) (Potten et al. 2002). Cela leur permet d'éviter toute mutation qui puisse être délétère. Des données non publiées mais présentées au congrès DDW (Digestive Disease Week, Los Angeles, du 20 au 25 mai 2006) en 2006 montraient que ce mécanisme n'est pas présent dans les cryptes du colon chez la souris. Si on transpose ces résultats à l'homme, cela pourrait être une explication au fait que les cancers de l'intestin grêle sont nettement moins fréquents que les cancers du colon.

## **Deuxième partie : LES HORMONES**

### **THYROÏDIENNES**

#### **III. Les hormones thyroïdiennes et leurs récepteurs**

##### ***A. Synthèse des hormones thyroïdiennes***

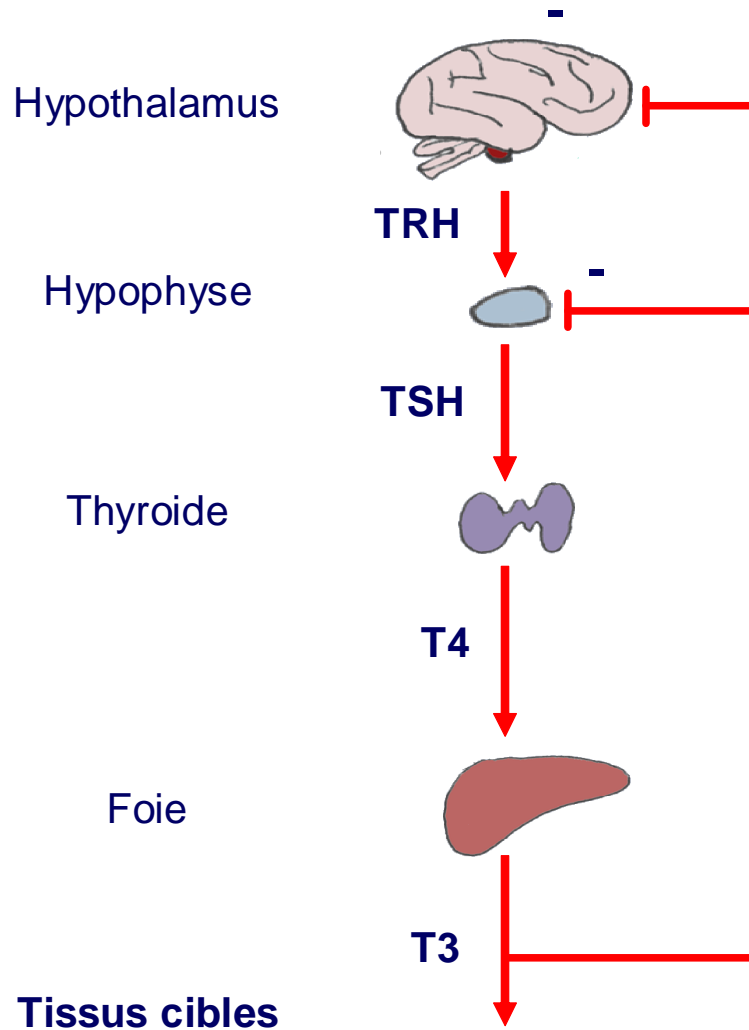
Le contrôle de la synthèse des hormones thyroïdiennes se fait par un axe hypothalamo-hypophysaire (Figure 10A) (Fredric and Wondisford 2004). La glande thyroïde produit une hormone, la thyroxine ou  $T_4$ . Cette hormone est transportée par le sang jusqu'au foie et aux organes périphériques, où elle est déiodinée par les  $T_4$  5'-déiodinases de types I et II (Figure 10B). Cette perte d'un atome d'iode aboutit à la formation de l'hormone tri-iodothyronine  $T_3$ , qui est l'hormone qui se lie à des récepteurs intracellulaires et agit par la voie nucléaire (St Germain and Galton 1997).

Les principaux organes capables de transformer la  $T_4$  en  $T_3$  sont le foie et le rein, responsables des deux tiers de la production de  $T_3$  du corps, ainsi que le cerveau et le tissu adipeux brun (Brent 1994)

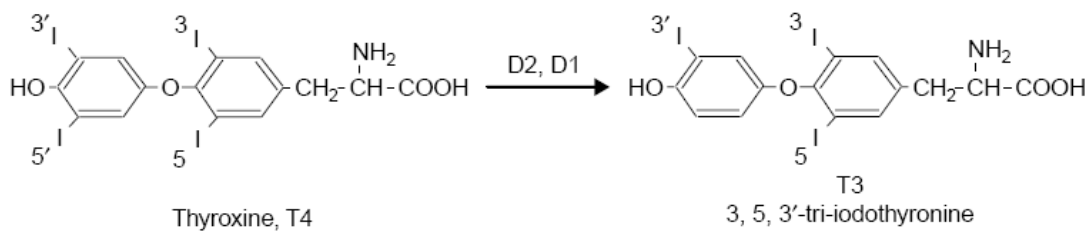
##### ***B. Les TR, récepteurs nucléaires aux hormones thyroïdiennes***

Les récepteurs des HT sont des récepteurs nucléaires qui sont à la fois capables de fixer le ligand  $T_3$  et de se lier à l'ADN pour agir sur la transcription de gènes cibles. Ce sont donc des facteurs de transcription. Les données bibliographiques que je présente ici font référence aux HT et aux TR chez la souris, mais sont globalement généralisables à l'amphibien ainsi qu'à l'humain.

**A – Voie de régulation de la synthèse d’hormone thyroïdienne**



**B - Transformation de la Thyroxine en Tri-iodothyronine**



**Figure 10: Voie de synthèse des hormones thyroïdiennes**

La synthèse de la T<sub>4</sub> par la thyroïde est régulée par un axe hypothalamo-hypophysaire. La régulation de la TSH et de la TRH implique TR $\beta$ . La T<sub>4</sub> est ensuite clivée en T<sub>3</sub> notamment par les déiodases du foie.

## 1. La famille des récepteurs nucléaires

Les récepteurs nucléaires lient différents ligands hydrophobes comme les stéroïdes, la vitamine D, l'acide rétinoïque ou encore les HT. Certains récepteurs sont appelés récepteurs orphelins car ils n'ont pas de ligands connus (Laudet et al. 1992). Ils sont tous composés de différents domaines homologues permettant la fixation du ligand, la dimérisation et la fixation à l'ADN (Laudet et al. 1992). Les différents récepteurs nucléaires ont évolué à partir de la duplication d'un gène ancestral (Laudet et al. 1992).

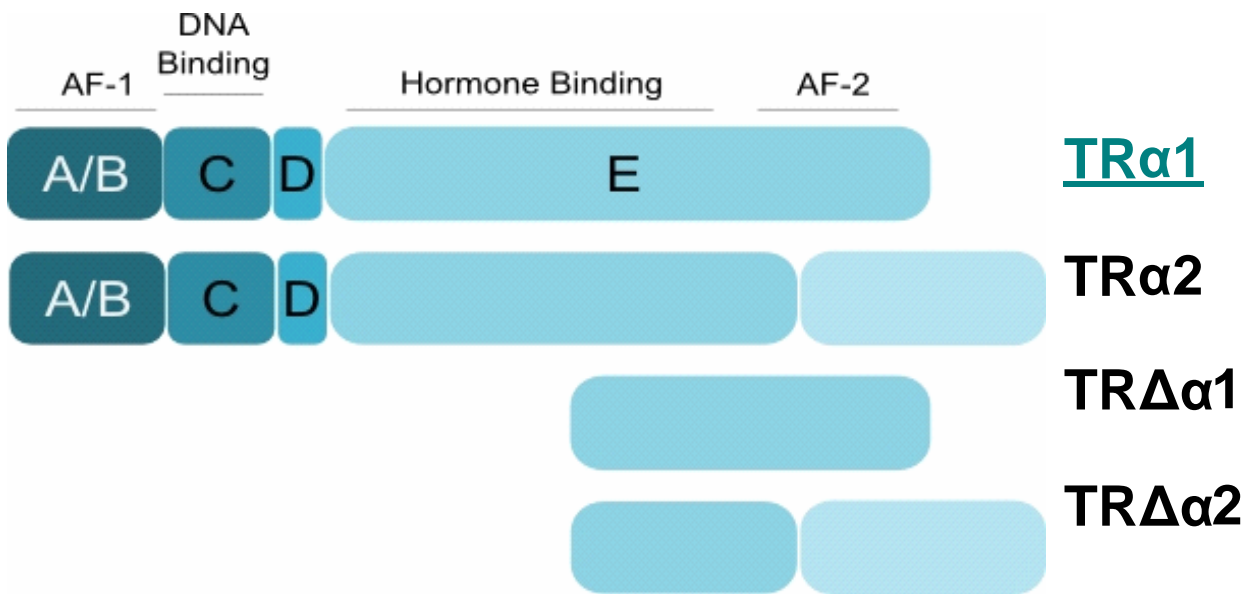
## 2. Les gènes codant les récepteurs aux HT

Les récepteurs aux hormones thyroïdiennes (TR) sont codés par deux gènes *TRα* (chromosome 11) et *TRβ* (chromosome 14). Chacun de ces gènes peut générer, grâce à l'utilisation de promoteurs internes et/ou d'épissage alternatif, différents isoformes protéiques (Figure 11) (Bassett and Williams 2003).

Le locus *TRα* code quatre isoformes parmi lesquels seul TRα1 peut lier ligand et ADN (Bassett and Williams 2003) (Figure 11A). TRα1 et TRα2 sont issus d'un épissage alternatif du transcrit primaire (Koenig et al. 1989). TRΔα1 et TRΔα2 sont issus de l'épissage alternatif d'un transcrit secondaire débutant à partir d'un promoteur interne situé dans l'intron 7 (Chassande et al. 1997). Les formes TRα2, TRΔα1 et TRΔα2 sont des antagonistes de TRα1 car elles piègent le ligand sans activer la transcription des gènes cibles (Chassande et al. 1997). TRα1 et TRα2 sont exprimés dans tous les organes alors que les formes courtes TRΔα1 et TRΔα2 sont exprimés surtout dans l'épithélium intestinal, les poumons, le cerveau et l'embryon précoce (Flamant and Samarut 2003).

Le locus *TRβ* code quatre isoformes dont trois récepteurs, TRβ1, TRβ2 et TRβ3, sont issus de trois sites différents d'initiation de la transcription (Figure 11B) (Flamant and Samarut 2003). Une forme TRΔβ3 ne contient pas de domaine de liaison à l'ADN et se comporte comme un inhibiteur des trois récepteurs TRβ (Williams 2000). Il est à noter que

## A – Récepteurs TR $\alpha$



## B – Récepteurs TR $\beta$

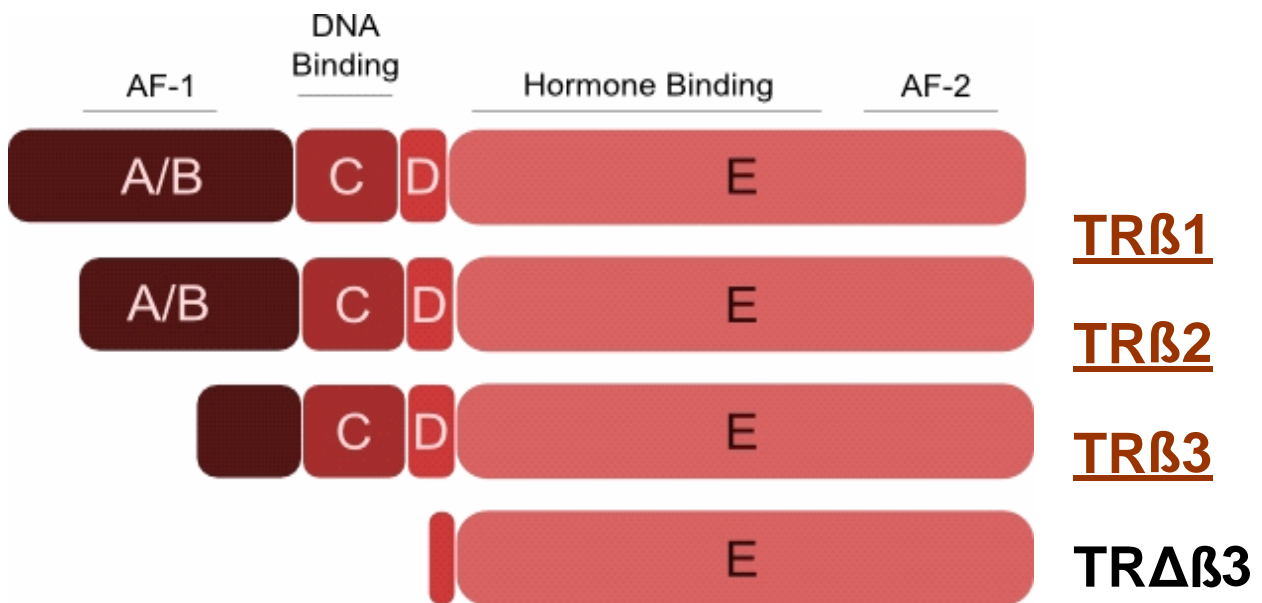


Figure 11: structure des isoformes des récepteurs aux hormones thyroïdiennes



TR $\beta$ 3 et TR $\Delta\beta$ 3 n'ont été mis en évidence que chez le rat (Williams 2000). TR $\beta$ 1 est exprimé de manière ubiquitaire, et massivement dans le foie. L'expression de TR $\beta$ 2 est restreinte à l'hypophyse et aux neurones TRH de l'hypothalamus, ainsi qu'à la rétine et à l'oreille interne en développement. TR $\beta$ 3 est présent dans le foie, les reins et les poumons et TR $\Delta\beta$ 3 dans les muscles squelettiques, le cœur, la rate et le cerveau (Flamant and Samarut 2003).

### **3. Les différents domaines des TR et leurs fonctions**

Les principaux domaines caractéristiques des TR en tant que récepteurs nucléaires sont le domaine de liaison à l'ADN (DBD) et le domaine de liaison à l'hormone (HBD) (Figure 11). Ces domaines sont très conservés entre les espèces (Mangelsdorf et al. 1995). Le DBD contient deux domaines à doigts de zinc (Brent 1994; Yen 2001). Le HBD permet la fixation de l'hormone ainsi que l'interaction avec des co-régulateurs (Mangelsdorf et al. 1995). Les domaines Activating Function 1 et Activating Function 2 (AF), situés aux extrémités amino-terminale et carboxy-terminale, sont responsables de la transactivation indépendante ou dépendante de l'hormone respectivement (Gonzalez-Sancho et al. 2003). L'extrémité amino-terminale contient également des séquences de localisation nucléaire (NLS) (Andersson and Vennstrom 1997).

### **4. Mode d'action des TR**

#### **a) Les éléments de réponse aux hormones thyroïdiennes**

Les TRs se fixent à l'ADN sur une séquence particulière appelée Thyroid hormone Response Element (TRE), située en règle générale dans la région des promoteurs des gènes cibles. La séquence consensus canonique du TRE est un tandem de AGGT(C/A)A en répétition directe, séparés par quatre paires de bases, d'où l'appellation de Direct Repeat 4, (Yen et al. 2006). Cependant, les TRE présents dans les promoteurs de gènes cibles diffèrent souvent de ce consensus de par leur arrangement en palindromes ou en palindromes inversés

ou encore par le nombre de nucléotides séparant les répétitions (Glass 1994). Une hypothèse expliquant la capacité des TR à réguler l'expression de gènes à partir d'une large variété de TRE serait que l'hétérodimérisation avec RXR ne se fait pas de la même façon suivant la séquence du TRE, puisque la conformation de TR s'adapte au TRE (Yen et al. 2006).

## b) Régulation transcriptionnelle par les TR

Les TR régulent la transcription en présence et en absence de ligand. La figure 3 présente l'exemple du contrôle de l'expression d'un gène régulé positivement par les HT.

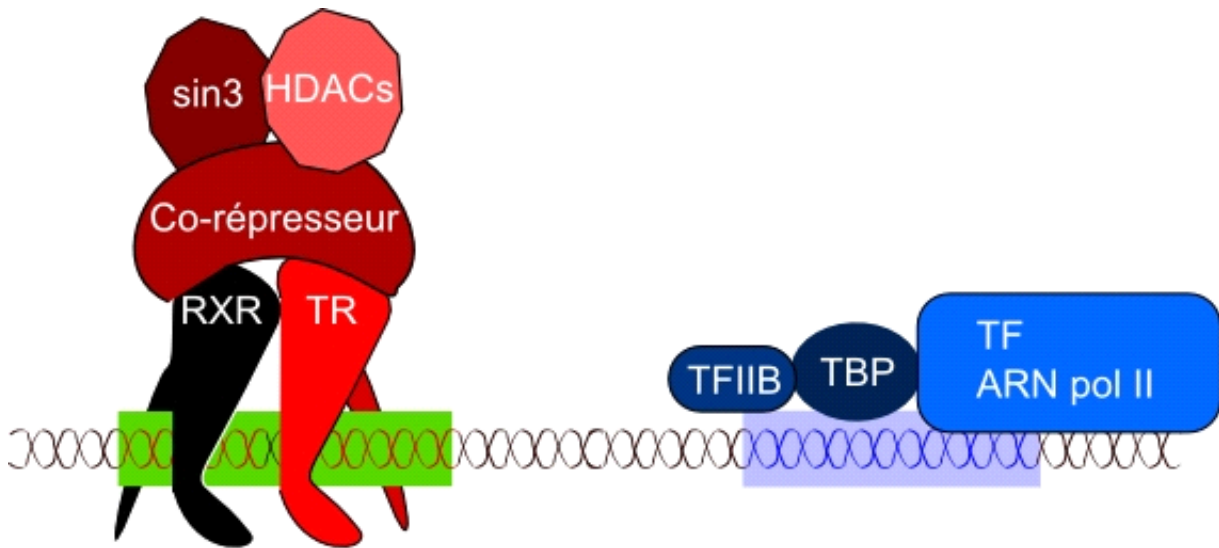
### Répression :

Dans la figure 12A, les hétérodimères TR/RXR sont fixés sur le TRE (boîte verte). Des co-répresseurs, NCoR (Nuclear receptor Co-Repressor) et SMRT (silencing mediator for retinoic acid receptor and TR) reconnaissent les TR sans ligand et répriment la machinerie transcriptionnelle sur la boîte TATA (boîte bleue) (Chen and Evans 1995; Horlein et al. 1995). Ils peuvent également former un gros complexe avec des répresseurs de la transcription comme sin3, ainsi qu'avec des Histones déacétylases (HDACs) qui contribuent à garder la structure locale de la chromatine dans une conformation impropre à la transcription d'un gène (Nagy et al. 1997). De plus, des études avaient montré auparavant que les TR sans ligand pouvaient inhiber directement la mise en place du complexe de pré-initiation de la transcription (Fondell et al. 1993).

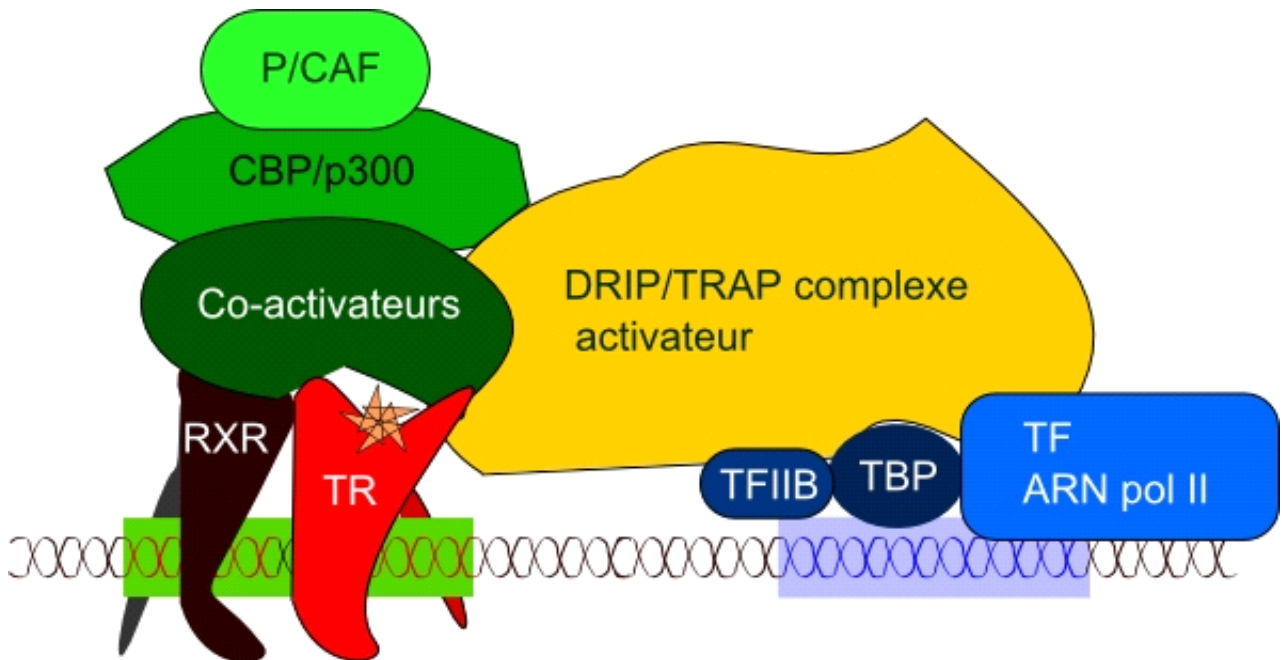
### Activation :

Lorsque la  $T_3$  se fixe à un TR, celui-ci change de conformation tridimensionnelle, ce qui permet le largage des co-répresseurs et l'interaction avec des co-activateurs (Figure 12B) (Feng et al. 1998). Ce basculement nécessite à la fois la présence de protéines d'échange et une voie de dégradation des protéines active (Flamant et al. 2007). Un co-activateur bien connu est le steroid receptor co-activator SRC, protéine de 160 kDa qui s'associe à plusieurs récepteurs d'hormone de façon ligand-dépendante (Onate et al. 1995). Il existe plusieurs

**A – Répression basale en absence de T<sub>3</sub>**



**B – Activation de la transcription en présence de T<sub>3</sub>**



**Figure 12: bases moléculaires de la régulation de la transcription par TR et TH**

En absence de T<sub>3</sub>, les hétérodimères TR/RXR sont complexés avec des co-répresseurs et ne peuvent interagir avec la machinerie de transcription. Les gènes cibles sont donc réprimés;

En présence de T<sub>3</sub>, le changement de conformation de TR éjecte les corépresseurs et permet la fixation de co-activateurs qui vont recruter un adaptateur entre le complexe TR/RXR et la machinerie de transcription. Les gènes cibles sont alors exprimés.

membres de la famille SRC ayant les mêmes capacités d'activation de la transcription (Yen 2001). Les SRCs interagissent avec des co-intégrateurs comme CBP ou p300 qui servent de pont entre les récepteurs nucléaires et la machinerie basale de transcription. CBP (CREB binding protein) est nécessaire à l'activation de promoteurs AMPc-dépendants par la protéine CREB (cAMP-response element-binding protein) (McKenna et al. 1999). P300 a des fonctions similaires de co-intégration de l'activation transcriptionnelle par différents facteurs de transcription (McKenna et al. 1999). Le complexe CBP/p300 interagit avec PCAF (p300/CBP associated protein), un activateur de la transcription (Yen et al. 2006). Les différents partenaires de l'activation par TR ont également des activités d'histones acétyltransférases, qui permettent la relaxation de la chromatine dans les régions promotrices des gènes cibles (Yen et al. 2006).

Un autre complexe impliqué dans l'activation de la transcription est le complexe DRIP/TRAP (vitamin D receptor interacting protein/TR associated protein). Il contient environ 15 protéines de taille variable (Yen et al. 2006). Certaines d'entre elles servent d'ancrage au TR pour le complexe, d'autres interagissent avec l'ARN polymérase II (Rachez and Freedman 2001). L'activation de la transcription d'un gène cible de  $T_3$  serait donc un processus séquentiel impliquant : 1- la liaison de SRC à un TR, SRC étant un intermédiaire pour la fixation de facteurs de décondensation de la chromatine ; 2- la liaison avec le complexe DRIP/TRAP qui recrute l'holoenzyme et les facteurs de base sur la boîte TATA (en bleu sur la figure 3B) nécessaires à la transcription d'un gène.

Il existe également des gènes qui sont réprimés en présence de  $T_3$ . Il semblerait que les TRE « négatifs » soient généralement très proches du site d'initiation de la transcription voire même après la boîte TATA (Yen 2001). L'un des cas les mieux connus de gène régulés négativement est celui de la TSH (thyrothropin stimulating hormone) et de la TRH (thyrothropin releasing hormone), qui sont impliquées dans la régulation de la synthèse des

HT (Figure 1A). Les TR liés à la  $T_3$  sont capables, dans le cas d'une régulation négative, de recruter des HDAC, qui referment la chromatine et rendent de ce fait l'initiation de la transcription impossible (Eckey et al. 2003). SMRT, normalement un co-répresseur fixé à TR en absence de  $T_3$ , peut fonctionner comme un co-activateur (Berghagen et al. 2002). De même, NCoR intervient dans l'activation de gènes cibles en absence de  $T_3$  (Satoh et al. 1999). Des changements de conformation tridimensionnelle des TR dus à des variations dans la séquence des TRE seraient à l'origine de l'action des cofacteurs (Berghagen et al. 2002).

## ***C. Rôle des hormones thyroïdiennes et des TR***

### **1. TR et développement**

Les modèles murins d'invalidation des gènes des TR ont permis de montrer que les TR ne sont pas essentiels au développement embryonnaire, dans la mesure où les souriceaux sont viables et n'ont pas de phénotype délétère à la naissance (Plateroti et al. 2004). Le taux de  $T_3$  augmente très fortement au cours des 2 premières semaines de vie post-natale, déclenchant l'activation d'un grand nombre de gènes nécessaires à la croissance, au sevrage etc.... (Plateroti et al. 2004). Le récepteur le plus important dans cette activation massive de gènes cibles est TR $\alpha$ 1 (Tinnikov et al. 2002).

### **2. TR et vie post-natale**

Un des principaux organes cible des TR est le système nerveux. TR $\beta$  est impliqué dans la maturation des cellules de la rétine et de la cochlée (Forrest et al. 2002). Les souris hypothyroïdiennes présentent un défaut de prolifération, de survie et de migration des neuroblastes de la couche granulaire externe du cervelet (Morte et al. 2002).

Chez les mammifères, les HT contrôlent la température corporelle en stimulant la thermogenèse dans les tissus adipeux bruns (Johansson et al. 1998). Elles sont également impliquées dans des processus aussi généraux que le métabolisme des lipides (Loeb 2000),

l'assimilation du glucose (Dimitriadis et al. 2006) ou encore la dégradation du cholestérol (Gullberg et al. 2002; Plateroti et al. 2004).

## **IV. Fonctions des hormones thyroïdiennes dans le développement intestinal des amphibiens**

### ***A. Les TR dans la métamorphose***

La métamorphose dépend totalement des HT, pour son initiation comme pour son bon déroulement (Buchholz et al. 2006). Elle ne commence que lorsque le têtard a atteint la taille requise. Elle nécessite par conséquent une régulation fine de la production d'HT, régulation qui passe par un axe hypothalamus-hypophyse-glande thyroïde proche de celui présenté dans la figure 1A. Les signaux originaux sont d'ordre environnementaux, nutritionnels et hormonaux (Buchholz et al. 2006).

Un aspect fondamental des HT dans le contrôle de la métamorphose est la synchronisation. Il est en effet nécessaire, par exemple, que les poumons soient fonctionnels avant que les branchies ne se résorbent. Un des mécanismes de contrôle de la synchronisation est la sensibilité des tissus aux HT (Furrow and Neff 2006). Par exemple, le bourgeonnement et la croissance des membres sont stimulés par un taux d'HT circulantes faible, alors que la queue ne régresse que lorsque le taux a atteint son maximum. Ces variations de sensibilité des tissus est due à la fois au type de déiodinase exprimée et aux niveaux d'expression des TR et de leurs co-activateurs et co-répresseurs (Furrow and Neff 2006).

## ***B. Le cas particulier de l'intestin***

### **1. Implication des TR dans le remodelage de l'épithélium**

#### **a) TR $\beta$**

Chez le xénope, et contrairement aux vertébrés, le gène *TR $\beta$*  est induit de façon ubiquitaire par le taux d'HT circulantes, *in vivo* comme lors d'expérience *in vitro* de traitement des têtards à la T<sub>3</sub> (Shi and Ishizuya-Oka 2001). Cette régulation est directe dans la mesure où l'ajout d'un inhibiteur de la synthèse protéique dans l'eau de culture des têtards ne supprime pas l'augmentation de l'expression de *TR $\beta$*  (Shi and Brown 1993). Des analyses du promoteur de *TR $\beta$*  ont montré qu'il contient un TRE quasi parfait (Wong et al. 1998a). Dans l'intestin spécifiquement, la régulation de *TR $\beta$*  par les HT est de plus cellule-autonome dans la mesure où des cellules épithéliales larvaires isolées conservent la régulation lorsqu'elles sont traitées à la T<sub>3</sub> (Shi and Ishizuya-Oka 2001).

En utilisant la technique d'hybridation *in situ*, Yun-Bo Shi et ses collaborateurs ont analysé les variations de l'expression de *TR $\beta$*  au cours de la métamorphose (Shi and Ishizuya-Oka 1997). *TR $\beta$*  est fortement exprimé dans les cellules épithéliales larvaires, juste avant le début de l'apoptose massive. Une fois que celle-ci est bien entamée, le niveau baisse. De même, les cellules épithéliales adultes en prolifération expriment fortement TR $\beta$  dès qu'elles sont identifiables dans les primordia de l'épithélium adulte (cf. première partie, chapitre I, B. 2. (b)). Le niveau de *TR $\beta$*  ne diminue que lorsque les cellules épithéliales adultes commencent à se différencier. Le tissu conjonctif et le muscle suivent la même séquence d'expression du *TR $\beta$* . *TR $\beta$*  est donc impliqué à la fois dans l'apoptose et dans la prolifération. Cette dualité peut s'expliquer par les différences de niveaux d'expression de *TR $\beta$*  entre les types cellulaires, ainsi que par la régulation du taux de T<sub>3</sub> circulant.

## b) TR $\alpha$

Au cours de la métamorphose du xénope, le gène *TR $\alpha$*  ne présente pas de modifications importantes de son expression. Il est exprimé constitutivement dans de nombreux tissus, avant même la formation de la thyroïde, mais n'est pas une cible des HT, bien que son expression augmente légèrement au cours de la pré-métamorphose (Yaoita and Brown 1990). L'importance de son action dans la métamorphose de différents organes, dont l'intestin, a pu être mise en lumière grâce à une approche de transgénèse (Schreiber et al. 2001). Les auteurs ont créé des têtards transgéniques exprimant une protéine TR $\alpha$  mutante dominante-négative sous le contrôle d'un promoteur ubiquitaire, et ont analysé l'effet de ce dominant négatif sur la métamorphose induite par un traitement à la T<sub>3</sub>. Les têtards transgéniques sont fortement résistants à la T<sub>3</sub>, et ne présentent notamment pas de remodelage de l'intestin. Les effets spécifiques de *TR $\alpha$*  sur la métamorphose de l'intestin n'ont pas été étudiés plus avant à ce jour. Une hypothèse cependant serait que *TR $\alpha$*  pourrait être impliqué dans l'activation de cibles directes précoces des HT, et notamment *TR $\beta$*  (Shi and Ishizuya-Oka 1997).

## 2. Les HT et la niche épithéliale

Comme je l'ai dit dans la première partie, le mode d'émergence des cellules épithéliales adultes est sujet à controverse. Je vais présenter ici les données qui expérimentales disponibles sur ce sujet.

### a) Le remodelage de la matrice extracellulaire (ECM)

La lame basale, ou ECM, subit une modification structurale importante au cours de la métamorphose, comme je l'ai présenté dans la première partie. L'ECM est composée de différentes protéines, comme les laminines, les protéoglycanes, les collagènes etc. Les mécanismes de remodelage de l'ECM sont encore mal connus mais il pourrait y avoir au



départ un phénomène simplement mécanique : comme l'intestin se raccourcit, la lame basale se contracte et s'épaissit. Cependant, la perméabilité accrue nécessite également un changement de composition, et plus particulièrement l'intervention des métalloprotéases de matrice ou MMP (Ishizuya-Oka and Shi 2005). Le gène de la stromelysine 3 (*ST3*), appartenant à la famille des MMP, a été identifié comme étant une cible de  $T_3$  (Patterton et al. 1995). Son expression corrèle de manière spatiotemporelle avec le remodelage de l'épithélium et de la lame basale (Ishizuya-Oka and Shi 2005). L'addition d'un anticorps dirigé contre le domaine catalytique de *ST3* sur des cultures d'intestin total inhibe l'induction par la  $T_3$  de la modification de la lame basale, de l'apoptose des cellules épithéliales larvaires et de l'invasion des primordia d'épithélium adulte (Ishizuya-Oka et al. 2000). A l'inverse, la surexpression de *ST3* conduit à l'apoptose des cellules épithéliales larvaires et à l'invasion des cellules épithéliales adultes dans le tissu conjonctif, et ce en absence de toute induction par la  $T_3$  (Fu et al. 2005). L'induction de l'expression de *ST3* par les HT, et le changement structural de l'ECM qui s'ensuit est donc une étape clé du développement de l'épithélium adulte. Cependant, la différence de réaction des épithélia larvaires et adultes face à l'expression de *ST3* reste à expliquer.

### b) Rôles de l'expression de Shh et BMP4

Nous avons vu que le compartiment prolifératif chez la souris a besoin d'interactions entre l'épithélium et le mésenchyme, pour sa mise en place comme pour son maintien. Des expériences de cultures de tissus d'intestins de têtard ont montré que de telles interactions sont également nécessaires à l'établissement de l'épithélium adulte dans l'intestin du xénope (Shi and Ishizuya-Oka 1996). Dans la première partie, j'ai évoqué l'existence de contacts entre les primordia de l'épithélium secondaire et les fibroblastes localisés juste en dessous dans le tissu conjonctif (Ishizuya-Oka and Shi 2005). Ce cas de figure rappelle beaucoup la « niche » des cellules souches épithéliales que l'on retrouve chez la souris.

#### BMP4 :

Le groupe d'Atsuko Ishizuya-Oka a identifié le gène *BMP4* comme étant une cible des HT dans l'intestin grêle du xénope (Ishizuya-Oka et al. 2001a). L'expression de *BMP4* devient détectable dans le tissu conjonctif, de manière concomitante à l'apparition des primordia épithéliales, et diminue lorsque les cellules adultes se différencient. De plus, *BMP4* est répartie sous forme d'un gradient vers l'épithélium, la concentration maximale étant atteinte dans les fibroblastes subépithéliaux. *BMP4* se comporte donc comme un morphogène pour le développement de l'épithélium adulte (Ishizuya-Oka 2007). Des expériences d'inhibition de l'activité de *BMP4* dans des cultures d'intestins indiquent qu'il supprime la prolifération des fibroblastes du tissu conjonctif et favorise la différenciation des cellules épithéliales adultes (Ishizuya-Oka et al. 2006).

Le dialogue entre l'épithélium et le mésenchyme se fait dans les deux sens dans la mesure où l'induction de l'expression de *BMP4* dans les fibroblastes ne se fait qu'en présence d'épithélium (Ishizuya-Oka et al. 2001a). Il est donc clair que l'épithélium larvaire secrète un facteur soluble en réponse à la  $T_3$ , facteur qui va alors activer l'expression de *BMP4*.

#### Shh :

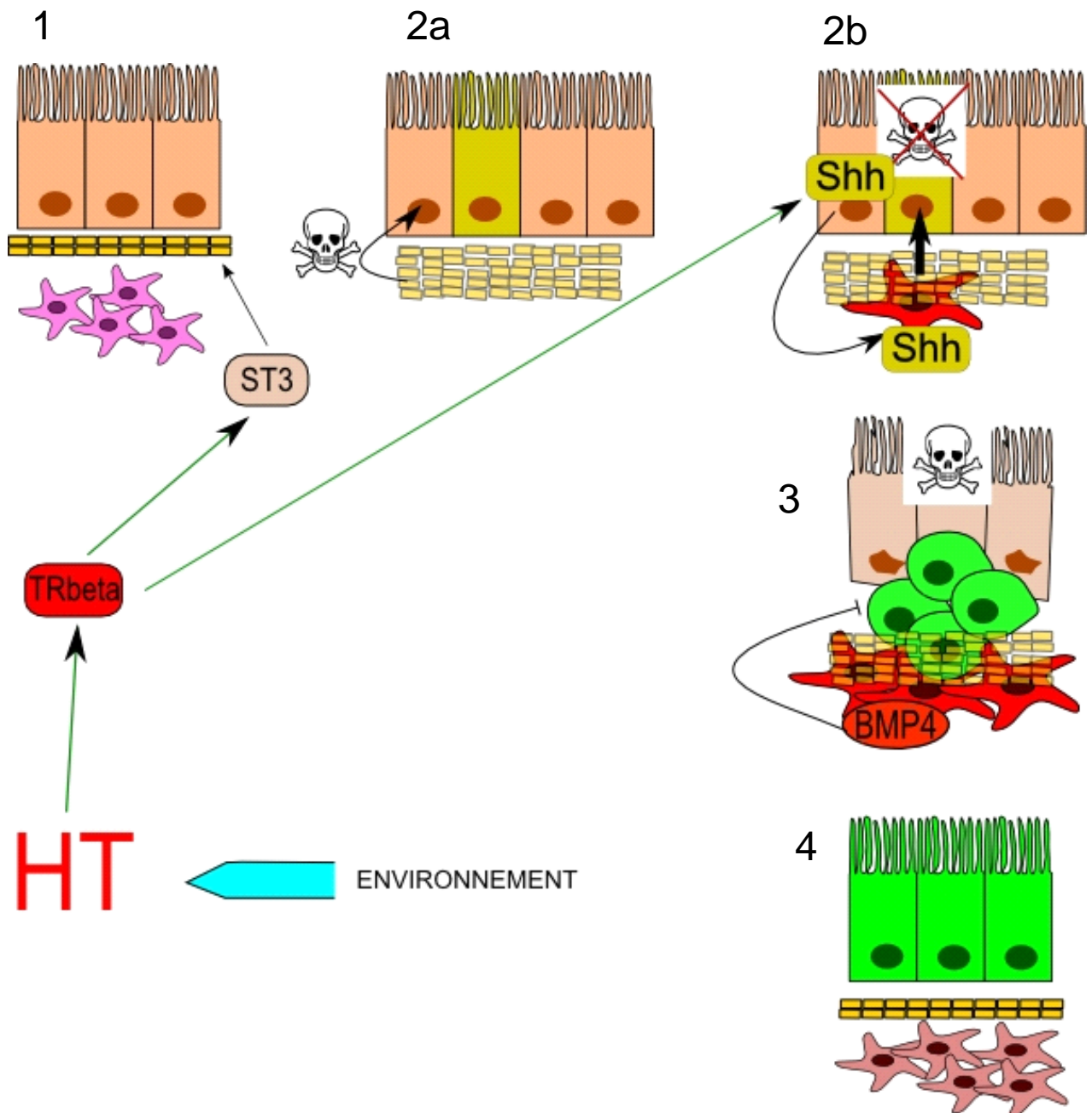
*Sonic hedgehog* a été identifié comme étant une cible directe des HT dans l'épithélium (Stolow and Shi 1995). Son expression corrèle avec la dédifférenciation puis avec la prolifération des précurseurs de l'épithélium adulte (Ishizuya-Oka et al. 2001b). La protéine Shh sécrétée par l'endoderme est bien connue comme étant un activateur de l'expression de *BMP4* dans le mésenchyme chez les vertébrés supérieurs (voir première partie) (Roberts et al. 1998). Il était raisonnable de considérer alors Shh comme un bon candidat pour jouer le rôle d'intermédiaire entre les HT et l'induction de l'expression de *BMP4* dans les fibroblastes subépithéliaux. Ishizuya-Oka et son équipe ont traité du tissu conjonctif intestinal séparé de l'épithélium à la  $T_3$ , sans aucun effet sur l'expression de *BMP4* (Ishizuya-Oka et al. 2006).

Lorsqu'ils ajoutent le facteur Shh, l'ARNm BMP4 devient détectable. Sonic hedgehog est donc bien responsable de l'activation de l'expression de *BMP4* par les fibroblastes.

### c) Modèle général de l'action des HT sur le développement de l'épithélium adulte au cours de la métamorphose

La figure 13 présente un modèle résumant les rôles des gènes cibles des HT dans le remodelage de l'intestin.

- **1** : l'épithélium larvaire est présent dans l'intestin du têtard ; des signaux environnementaux activent la production d'HT ; les récepteurs TR $\alpha$  présents activent la transcription de TR $\beta$  dans tous les tissus intestinaux ; TR $\beta$  active des gènes précoces comme *ST3* ;
- **2a** : la ST3 change la composition de la lame basale en dégradant des protéines de la matrice extracellulaire ; les interactions entre l'épithélium larvaire et l'ECM sont perturbées, ce qui initie la cascade aboutissant à la mort cellulaire par apoptose ;
- **2b** : la modification de la lame basale permet l'interaction directe des cellules épithéliales (en vert) avec les fibroblastes sous-jacents, ce qui empêche l'accomplissement de l'apoptose dans ces cellules épithéliales ; l'expression de *Shh* est induite par les TR et les HT dans les cellules épithéliales larvaires en contact avec des fibroblastes ; Shh favorise alors la prolifération de ces cellules, ainsi que la prolifération des fibroblastes ;
- **3** : Shh induit l'expression de *BMP4* dans les fibroblastes ; BMP4 va inhiber la prolifération des fibroblastes et favoriser la différenciation des cellules épithéliales émergentes ;



**Figure 13 : la niche épithéliale lors de la métamorphose de l'intestin du xénope**

**1:** La synthèse de HT induite par l'environnement active l'expression de ST3; **2a:** La dégradation de l'ECM par ST3 initie l'apoptose de l'épithélium larvaire, y compris des futurs progéniteurs adultes (en vert); **2b:** les fibroblastes sous-épithéliaux inhibent l'apoptose dans les futurs progéniteurs adultes; les HT induisent l'expression de *Shh* dans les futurs progéniteurs adultes; *Shh* agit à la fois sur la dédifférenciation de ces cellules et sur la prolifération des fibroblastes; **3:** *Shh* induit l'expression de *BMP4* dans les fibroblastes; *BMP4* va induire la différenciation des progéniteurs adultes; **4:** les gènes cibles des HT s'éteignent, la lame basale et le tissu conjonctif reviennent à leur état initial et l'épithélium adulte est pleinement.

La couleur des protéines indique leur provenance cellulaire.

**4 :** le taux de T<sub>3</sub> redevient bas, tous les gènes cibles s'éteignent, la lame basale et le tissu conjonctif reviennent à leur état initial et l'épithélium adulte est pleinement fonctionnel.

Au regard de ce modèle, l'hypothèse d'Ishizuya-Oka (cf. partie 1), qui stipule que ces cellules émergent d'une population prédéterminée me semble mieux correspondre aux données expérimentales que l'hypothèse adverse (toutes les cellules larvaires ont la compétence pour devenir les progéniteurs des cellules adultes). Avant le début de la métamorphose, aucune cellule indifférenciée n'est visible dans l'épithélium (Ishizuya-Oka and Shi 2005). Cependant, seules quelques unes des cellules épithéliales larvaires résistent à l'apoptose, notamment grâce à l'interaction cellule à cellule avec les fibroblastes sous-jacents, et répondent aux HT en synthétisant Shh. Ces cellules résistantes doivent avoir un programme d'expression de gènes différents de leurs voisines, ce qui va dans le sens d'une population prédestinée à se différencier pour se remettre à proliférer et régénérer un épithélium adulte fonctionnel.

#### d) Comparaison souris/xénope

L'un des faits frappants lorsque l'on met en parallèle les données obtenues chez la souris et chez le xénope, est l'implication des voies BMP et Hedgehog. Dans les deux cas, un facteur Hh est synthétisé par l'épithélium et va activer la synthèse du facteur BMP4 dans le tissu conjonctif. Chez la souris cette activation passe par les facteurs FoxF, mais aucun détail sur les mécanismes existant chez le Xénope n'est connu. Il est également très vraisemblable que l'épithélium adulte du xénope se développe à partir d'une cellule souche exprimant Musashi. Dans l'optique de caractériser ces cellules souches potentielles, il serait intéressant de rechercher l'existence du marqueur *lrg5*, très récemment identifié comme étant spécifique des cellules souches intestinales chez la souris (Barker et al. 2007), chez le xénope.

L'une des différences majeures est l'absence totale de données décrivant une implication de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine dans les processus décrits précédemment. Cela est d'autant plus frappant que chez la souris, la  $\beta$ -caténine est un gène cible des HT, comme nous le verrons plus loin.

## **V. Les hormones thyroïdiennes dans le développement intestinal chez la souris**

### ***A. Les TR dans l'intestin***

#### **1. Développement précoce**

L'analyse du rôle des HT dans le développement prénatal est difficile à faire dans la mesure où l'hypothyroïdie induite chez la mère aboutit à un avortement (Smallridge et al. 2005). Grâce aux souris knock-out pour les TR, il a quand même été possible de déterminer que TR $\alpha$ 1 et TR $\alpha$ 2 sont exprimés dans l'endoderme intestinal, puis dans l'épithélium à partir de E 16,5 et ce jusqu'à PN14 (Plateroti et al. 2007).

#### **2. Développement postnatal**

Chez l'homme, les hypothyroïdies congénitales ou induites (environnement, chirurgie) ont un effet négatif sur la physiologie intestinale : l'absorption par les entérocytes est réduite et le relâchement de la musculature ralentit le transit intestinal (Freedberg and Halmolsky 1974).

Il existe un modèle murin d'hypothyroïdie sévère, les souris *Pax8* KO (Mansouri et al. 1998). Ces souris ont un défaut de développement de la thyroïde tel qu'elles sont quasiment athyroïdiennes et meurent durant les premières semaines de vie post-natale. Il est cependant possible de les sauver en injectant de la T<sub>4</sub> (Mansouri et al. 1998). Ces animaux ne présentent

pas de défauts de structure de la muqueuse intestinale à la naissance, grâce à la présence des HT produites par la mère. Après deux semaines de vie post-natale, la muqueuse est nettement réduite, suite à une diminution de la prolifération des progéniteurs épithéliaux (Flamant et al. 2002). L'injection d'HT rétablit un phénotype normal. Toutes ces données indiquent l'importance des HT dans le contrôle de l'homéostasie de l'épithélium intestinal.

Le transcript TR $\beta$  est exprimé dans l'épithélium intestinal à 12 jours post natal (PN) (Plateroti et al. 1999). Cependant, aucun défaut n'a pu être observé dans la morphologie intestinale, le taux d'enzymes digestives, ni dans l'expression des gènes régulant la prolifération et la différenciation (Plateroti et al. 1999). TR $\beta$  n'est donc pas le récepteur des HT impliqué dans la maturation de l'intestin. Nous allons voir dans le paragraphe suivant que TR $\alpha$  est le gène régulant l'effet des HT sur la muqueuse intestinale.

### ***B. TR $\alpha$ et la maturation de l'intestin au sevrage***

Les données obtenues chez les souris *pax8* KO, ainsi que le fait que le taux d'HT circulantes augmente pendant la deuxième semaine de vie postnatale chez la souris (Hadj-Sahraoui et al. 2000), suggèrent que les HT jouent un rôle dans le remodelage structurel et fonctionnel de l'intestin au moment du sevrage. Le sevrage des souriceaux a lieu à trois semaines. Il implique des changements des fonctions intestinales qui permettent le passage d'une alimentation lactée et liquide à une alimentation solide et plus complexe.

Les quatre isoformes TR $\alpha$  sont exprimés dans l'intestin (Plateroti et al. 2001). L'étude du phénotype de différentes lignées de souris mutantes pour ces isoformes entre deux et trois semaines a permis de comprendre le rôle de TR $\alpha$  dans la maturation de l'intestin. Les animaux TR $\alpha$  KO (aucun isoforme  $\alpha$  exprimé) ont une muqueuse intestinale plus fine que les WT, à cause d'une diminution de la prolifération des cellules des cryptes (Plateroti et al. 2001). L'hypothyroïdie expérimentale de ces souris n'aggrave pas leur phénotype intestinal ; elles sont également insensibles à l'injection d'HT. Ceci démontre que la prolifération des cellules

épithéliales en réponse aux HT est dépendante de TR $\alpha$ 1, dans la mesure où TR $\alpha$ 1 est le seul vrai récepteur TR $\alpha$  codé par le gène *TR $\alpha$*  (Plateroti et al. 2001).

L'analyse comparative des animaux *TR $\alpha$*  KO et *TR $\Delta\alpha$*  KO a permis de déterminer le rôle des isoformes *TR $\Delta\alpha$* . Ils inhibent la transcription des gènes *cdx1* et *cdx2* qui sont des importants pour le contrôle de l'homéostasie des cellules épithéliales. Le récepteur TR $\alpha$ 1 et les *TR $\Delta\alpha$*  agissent en synergie afin de contrôler la prolifération et la différenciation des cellules épithéliales au moment du sevrage (Plateroti et al. 2001). La figure 14 présente ce modèle de régulation par le gène *TR $\alpha$*  (Plateroti et al. 2007).

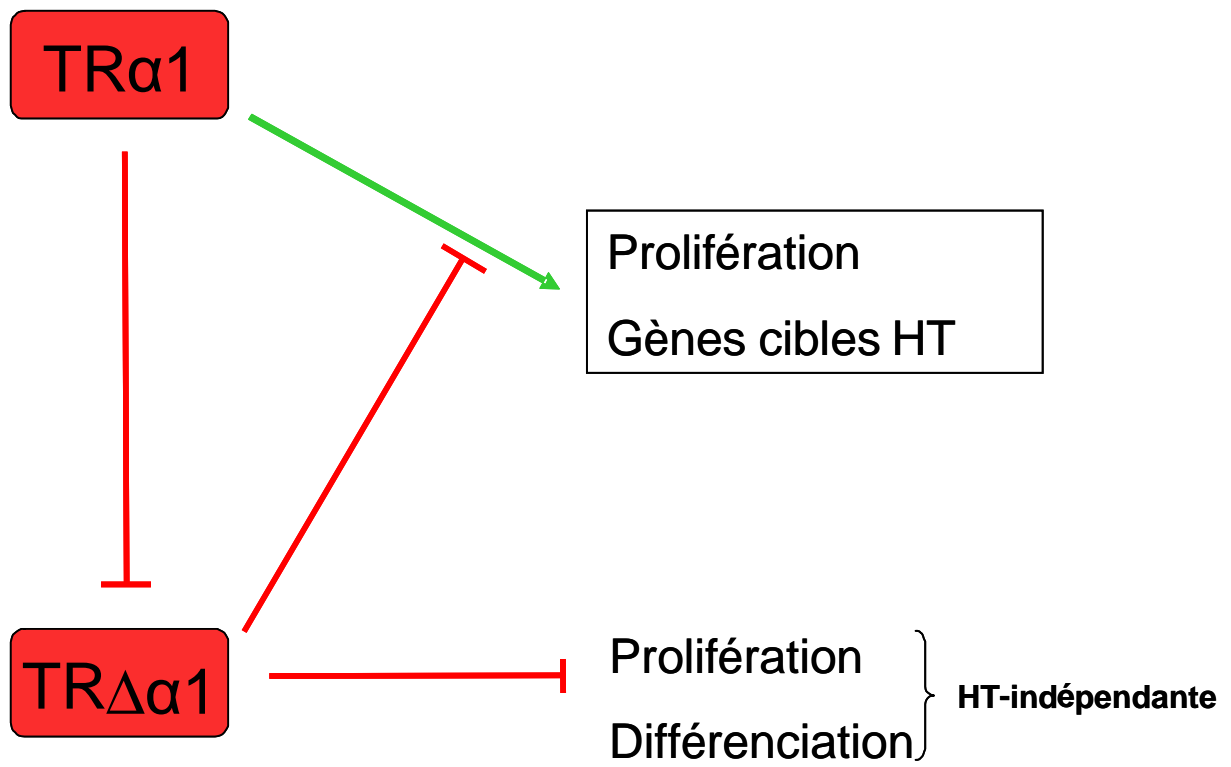
### **C. *TR $\alpha$ 1* et la prolifération des cellules des cryptes intestinales**

L'analyse de l'intestin jusqu'à 8 semaines montre que les souris *TR $\alpha$*  KO ont une diminution de 25 à 50 % du taux de prolifération des cellules épithéliales (Plateroti et al. 2006). Elles ont cependant des cellules des cryptes fonctionnelles capables de générer des villosités fonctionnelles, bien que raccourcies par rapport aux WT. Nous pouvons en conclure que *TR $\alpha$*  n'est pas indispensable au maintien des cellules souches, pas plus qu'à la détermination de la destinée cellulaire.

Nous avons vu dans le paragraphe précédent que TR $\alpha$ 1 contrôle la prolifération au moment du sevrage, mais c'est également vrai à l'âge adulte dans la mesure où les souris *TR $\alpha$*  KO ont réduction d'un tiers du nombre de cellules en prolifération dans les cryptes (Plateroti et al. 2006). De plus, une analyse de la localisation de TR $\alpha$ 1 montre qu'il n'est exprimé que dans les cryptes intestinales. Afin de mieux comprendre comment TR $\alpha$ 1 agit sur la prolifération des cellules épithéliales, nous nous sommes intéressés à la voie Wnt/ $\beta$ -caténine qui, comme nous l'avons vu dans la première partie, contrôle la prolifération des cellules des cryptes intestinales.

Nous avons recherché les niveaux d'expression de plusieurs partenaires de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine dans l'intestin de souris eu-, hypo- ou hyper-thyroïdiennes : APC, GSK3 $\beta$ ,





**Figure 14 : rôle des isoformes de TR $\alpha$  dans la maturation de l'intestin au sevrage**

Tcf4, Groucho et  $\beta$ -caténine. Seule l'expression de la  $\beta$ -caténine était diminuée chez les souris hypothyroïdiennes. L'injection des souris aux HT pendant deux jours aboutit à une augmentation de l'expression de *ctnb1*, ainsi que de ses cibles directes *c-myc* et *ccnd1*. De plus, chez les souris *TR $\beta$*  KO la régulation de l'expression de la  $\beta$ -caténine est préservée, alors qu'elle n'a plus lieu chez les *TR $\alpha$*  KO. C'est donc bien TR $\alpha$ 1 qui est responsable de cette régulation de  $\beta$ -caténine. Par la suite, une analyse de l'expression de  $\beta$ -caténine dans des cultures primaires d'épithélium traitées ou non à la T<sub>3</sub> a confirmé que la régulation était cellule épithéliale autonome et directe. Une analyse *in silico* du gène de la  $\beta$ -caténine a montré l'existence d'un TRE putatif dans l'intron 1. Des expériences de gel retard et de précipitation de chromatine ont montré par la suite qu'en présence de T<sub>3</sub>, TR $\alpha$ 1 se fixe à ce TRE.

Les HT et TR $\alpha$ 1 contrôlent donc la prolifération des cellules épithéliales en régulant l'expression de la  $\beta$ -caténine. Cependant, nous avons vu dans la première partie que la  $\beta$ -caténine n'active la transcription que lorsqu'un signal Wnt parvient à la cellule. Dans notre modèle, nous savons que TR $\alpha$ 1 active l'expression de  $\beta$ -caténine en présence de T<sub>3</sub>, mais nous n'avons pas d'explication au fait que la  $\beta$ -caténine soit activée. Une partie de mon travail de thèse a été de réaliser une analyse transcriptomique, afin de mieux comprendre comme les HT et les TR contrôlent la prolifération des cellules épithéliales intestinales.

#### ***D. Les HT et les pathologies cancéreuses***

Il n'y jusqu'à présent que peu d'études sur le rôle des HT et TR dans la physiopathologie intestinale. Cependant, une étude de carcinogenèse chimio-induite chez le rat montre que l'hyperthyroïdie est un facteur aggravant (Iishi et al. 1992). En médecine humaine, des cas de mutations (Wang et al. 2002), ou de délétion (Markowitz et al. 1989) des TR ont été associés à des tumeurs gastro-intestinales. Les résultats que nous avons obtenus sur la régulation directe de l'expression de  $\beta$ -caténine par TR $\alpha$ 1 ont ouvert des perspectives sur le rôle

potentiel de TR $\alpha$ 1 comme gène inducteur de tumeurs. Le sujet de ma thèse était de mieux comprendre comment TR $\alpha$ 1 régule la prolifération intestinale, et quel est son rôle dans la tumorigenèse.

# **RESULTATS**

## **I. Premier article:**

### **The TR $\alpha$ gene encoding the thyroid hormone receptor TR $\alpha$ 1 controls DNA-damage induced tissue repair**

Elsa Kress, Amelie Rezza, Julien Nadjar, Jacques Samarut and Michelina Plateroti

Université de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, Ecole Normale Supérieure de Lyon, INRA, CNRS, Institut de Génomique Fonctionnelle de Lyon, Lyon, France

**Accepté à Molecular Endocrinology**

#### **Abstract**

The thyroid hormone controls, via its nuclear receptor TR $\alpha$ 1, intestinal crypt cell proliferation in the mouse. In order to understand whether this receptor also plays a role in intestinal regeneration after DNA damage, we applied a protocol of gamma-ray irradiation and monitored cell proliferation and apoptosis at several time points. In wild type mice, the dose of 8 Gray induced cell cycle arrest and apoptosis in intestinal crypts a few hours after irradiation. This phenomenon reverted 48h after irradiation. TR $\alpha^{0/0}$  mutant mice displayed a constant low level of proliferating cells and a high apoptosis rate during the period of study. At the molecular level, in TR $\alpha^{0/0}$  animals we observed a delay in the p53 phosphorylation induced by DNA damage. Looking for the expression of the protein-kinases responsible for p53 phosphorylation upon irradiation, we have focused on DNA-PKcs. The number of cells expressing DNA-PKcs in crypts remained high 48h after irradiation, specifically in TR $\alpha$  mutants. Altogether, in TR $\alpha^{0/0}$  animals the rate of apoptosis in crypt cells remained high, apparently due to an elevated number of cells still presenting DNA damage. In conclusion, the TR $\alpha$  gene plays a role in crypt cell homeostasis by regulating the rate of cell renewal and apoptosis induced by DNA damage.

Les connaissances que nous avons du rôle du gène *TRα* dans la régulation de la prolifération de l'épithélium intestinal nous ont amenés à nous interroger sur son rôle dans la régénération après blessure. En effet, lorsque l'intestin est irradié, par exemple lors de séances de radiothérapie anticancéreuse, les cellules en prolifération subissent des dommages à l'ADN et meurent par apoptose afin d'éviter la propagation de mutations délétères. Il s'ensuit une perte de fonction de l'intestin et des effets secondaires gênants pour les patients. Par conséquent, les cryptes intestinales sont dépeuplées et les cellules survivantes doivent reconstituer le stock de progéniteurs prolifératifs afin de restaurer l'homéostasie du tissu. Ce processus, appelé régénération, nécessite un taux de prolifération supérieur à la normale. Nous avons décidé d'analyser l'effet de la perte du gène *TRα* sur la régénération de l'épithélium après irradiation afin d'étudier l'implication de la voie des HT dans un système physiologique perturbé.

Afin de réaliser cette étude, nous avons irradié des souris WT ou *TRα* KO à une dose de 8 grays, puis collecté les intestins 4h, 8h, 24h et 48h après. Nous avons choisi une dose de 8 grays car il a été montré que dans ces conditions 80% des cellules des cryptes intestinales meurent par apoptose car l'ADN est trop endommagé pour qu'elles engagent la réparation de l'ADN (Potten 2004).

D'un point de vue morphologique, nous avons observé une différence frappante entre les souris WT et *TRα* KO. En effet, au bout de 48h après irradiation, les cryptes intestinales commencent à se reformer chez les souris WT, alors que l'épithélium est totalement désorganisé chez les souris *TRα* KO. L'analyse de la prolifération montre qu'elle diminue fortement chez les souris WT après 4h, puis reprend à 48h, alors que chez les *TRα* KO, elle ne varie pas. L'apoptose est maximale à 8h PI (post irradiation) chez les WT, puis diminue jusqu'à quasiment disparaître à 48h, alors que chez les *TRα* KO elle atteint un maximum à 4h

puis ne baisse quasiment plus, même à 48h. Le fait que l'apoptose ne diminue pas chez les souris *TRα* KO nous a amené à analyser le nombre de cellules ayant encore des dommages à l'ADN au bout de 48h. Ces souris ont encore beaucoup de cellules endommagées dans les cryptes 48h PI.

Afin de comprendre pourquoi l'apoptose est si longue chez les souris *TRα* KO, nous avons analysé différents acteurs de la voie d'activation de p53, l'effecteur de la perception des dommages à l'ADN. Tout d'abord, le nombre de cellules exprimant p53 ne diminue pas chez les souris *TRα* KO, ce qui est cohérent avec le maintien de l'apoptose à 48h PI. Par la suite, le seul partenaire de la cascade d'alerte due aux cassures de l'ADN qui présente une expression différente chez les souris *TRα* KO comparées aux WT est DNA-PK. DNA-PK est la protéine qui se lie spécifiquement aux cassures et déclenche la cascade de phosphorylation aboutissant à l'activation de p53 (Burma and Chen 2004). L'ARNm et la protéine DNA-PK sont activés après irradiation puis diminuent après 4h chez les souris WT, alors que les niveaux restent élevés chez les souris *TRα* KO. Nous pouvons donc en conclure que *TRα* est nécessaire à l'inactivation de DNA-PK après la détection des dommages à l'ADN, mais le mécanisme de régulation est encore inconnu.

L'absence de reprise de la prolifération chez les souris *TRα* KO est par conséquent due à une apoptose qui ne diminue pas. En effet, DNA-PK reste activée, donc p53 continue à réprimer le cycle cellulaire via p21 et à activer l'apoptose. Le gène *TRα* joue donc un rôle important dans la régénération de l'épithélium intestinal par deux aspects : i) il active la prolifération des progéniteurs épithéliaux survivants ; ii) il favorise l'élimination rapide des cellules endommagées. Les conséquences de cette conclusion en terme de médecine humaine seront discutée dans la partie Discussion et Perspectives de ma thèse.

**The TR $\alpha$  gene encoding the thyroid hormone receptor TR $\alpha$ 1 controls DNA-damage induced tissue repair**

Elsa Kress, Amelie Rezza, Julien Nadjar, Jacques Samarut and Michelina Plateroti\*

Université de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, Ecole Normale Supérieure de Lyon, INRA, CNRS, Institut de Génétique Fonctionnelle de Lyon, Lyon, France

Running title: TR $\alpha$  and DNA damage

\*: Corresponding Author.

Mailing address: Institut de Génétique Fonctionnelle de Lyon, Ecole Normale Supérieure de Lyon, 46 allée d'Italie, 69364 Lyon Cedex 07, France.

Tel: 33 472728536

Fax: 33 472728080

E-mail: Michela.Plateroti@ens-lyon.fr

Key words: TR, thyroid hormone, intestine epithelium, p53

This work was supported by the Agence Nationale pour la Recherche (grant ANR-06-BLAN-0232-01) and the program Equipe Labellisée of the Ligue Nationale contre le Cancer. EK and AR studentships are supported by the Ligue Nationale contre le Cancer.

DISCLOSURE STATEMENT: The authors have nothing to disclose.



## **Abstract**

The thyroid hormone controls, via its nuclear receptor TR $\alpha$ 1, intestinal crypt cell proliferation in the mouse. In order to understand whether this receptor also plays a role in intestinal regeneration after DNA damage, we applied a protocol of gamma-ray irradiation and monitored cell proliferation and apoptosis at several time points. In wild type mice, the dose of 8 Gray induced cell cycle arrest and apoptosis in intestinal crypts a few hours after irradiation. This phenomenon reverted 48h after irradiation. TR $\alpha^{0/0}$  mutant mice displayed a constant low level of proliferating cells and a high apoptosis rate during the period of study. At the molecular level, in TR $\alpha^{0/0}$  animals we observed a delay in the p53 phosphorylation induced by DNA damage. Looking for the expression of the protein-kinases responsible for p53 phosphorylation upon irradiation, we have focused on DNA-PKcs. The number of cells expressing DNA-PKcs in crypts remained high 48h after irradiation, specifically in TR $\alpha$  mutants. Altogether, in TR $\alpha^{0/0}$  animals the rate of apoptosis in crypt cells remained high, apparently due to an elevated number of cells still presenting DNA damage. In conclusion, the TR $\alpha$  gene plays a role in crypt cell homeostasis by regulating the rate of cell renewal and apoptosis induced by DNA damage.

## Introduction

The thyroid hormones (TH), T3 and T4, play multiple roles in vertebrate development and homeostasis (1). T3 acts through nuclear receptors, the TRs, encoded by the *TR $\alpha$*  and *TR $\beta$*  loci. The TRs are transcription factors that activate or repress the transcription of target genes (2). The introduction of mutations in the TR genes in mice has allowed further understanding of the mechanisms mediating the multiple actions of TH in target tissues (3). One of the established targets of TH action is the intestine (4). The best characterized example is its extensive remodelling during the spontaneous or TH-induced amphibian metamorphosis (5).

The intestinal epithelium is a continuously renewing tissue. This depends on the presence of stem cells and committed progenitors located in the crypts of Lieberkühn. These display a very high proliferation rate (6). Radiation promotes cell death and induces compensatory regenerative proliferation in epithelial cells (7, 8). In light of its characteristic rapid turnover rate, the small intestine epithelium is one of the most radiosensitive tissues (8). The cellular and molecular events responsible for this radiosensitivity are starting to be understood. A few hours after irradiation the crypt cell proliferation is blocked and the cells undergo apoptosis. This process is reverted in a few hours, when apoptosis stops and cell proliferation resumes, refilling again the crypt compartments (8).

The p53 protein plays a major role in this process essentially as a “gatekeeper” (9). In fact, p53 activation by phosphorylation leads to different and coordinated responses (see scheme Figure 1S): a) up-regulation of p21 and DNA mismatch repair gene transcription, favouring cell cycle arrest and DNA repair; b) up-regulation of an apoptosis-promoting gene (ie Bax). The fact that in intestinal crypts p53 activation after gamma-ray irradiation preferentially induces apoptosis, led to the conclusion that in the small intestine this process is a protective mechanism, which efficiently removes from the tissue stem or progenitor cells with DNA damage (8). This might represent a supplementary mechanism for maintaining very low levels of mutations in crypt stem cells, and could help in explaining

why the small intestine is less prone to tumorigenesis compared to large intestine (10).

Thyroid hormones control intestinal development at weaning in the mouse (4). Indeed, mice lacking the expression of *TR $\alpha$*  gene have reduced cell proliferation in crypts during development and in adulthood (11). The same defect has been demonstrated in congenital or chemically induced hypothyroidism in mice (12, 13). Looking for molecular mechanisms, we have recently shown that the *TR $\alpha$ 1* receptor controls, through T3 binding, the expression of key components of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway (11).

This major role of *TR $\alpha$ 1* in intestine epithelial proliferation suggested that the *TR $\alpha$*  gene might control the regeneration process taking place after gamma-ray irradiation. To test this hypothesis, we studied the kinetics of recovery after irradiation of *TR $\alpha$*  mutant compared to the WT mice. We show that in *TR $\alpha$*  mutants, displaying a lower proliferation rate, the apoptosis in crypts is maintained at high levels for a longer time compared to the WT mice. This correlated with the sustained activation of the p53 protein pathway which mediates the apoptosis in crypt cells.

## Results

### *Morphological and functional features of the small intestine after $\gamma$ -ray irradiation*

To assess whether *TR $\alpha$*  gene plays a role in the regeneration of the small intestine, WT and *TR $\alpha$ <sup>0/0</sup>* mice were exposed to a single dose of 8 Gy of  $\gamma$ -ray irradiation. Histological features have been analyzed at several time points after irradiation and compared to the non irradiated intestine (Figure 1 A-J). Hematoxylin&Eosin staining of WT sections showed a clear-cut disorganisation of the crypt epithelium 24 hours after irradiation compared to the non-irradiated intestine (Figure 1 B,C vs A). In fact, those crypts were clearly smaller in size and displayed several apoptotic or ghosts of apoptotic cells (morphological criteria as in (14)). However, 48 hours after irradiation, these mice displayed emerging but structured crypts (Figure 1 D,E). Hematoxylin&Eosin staining of *TR $\alpha$ <sup>0/0</sup>* intestine sections revealed a similar disorganisation of the crypt epithelium 24

hours after irradiation, compared to the non-irradiated intestine (Figure 1 G,H vs F). This can be evaluated by the presence of several apoptotic cells in each crypt, as also described in the wild type crypts. However, 48 hours after irradiation  $TR\alpha^{0/0}$  exhibited still small and disorganized crypts compared to the WT at the same time point (Figure 1 I,J vs D,E).

#### *Analysis of cell proliferation and apoptosis*

The process of the small intestine regeneration implies both a massive apoptosis of the progenitors with DNA damage followed by an increased proliferation of the surviving ones (8). In order to determine whether the  $TR\alpha$  gene is implicated in these two processes, we analysed the proliferative and the apoptotic indexes of the crypt compartment of WT or  $TR\alpha^{0/0}$  mice at different time points after irradiation. To this end, paraffin-embedded sections of small intestine were immunostained for BrdU incorporation (Figure S2) and cleaved-caspase 3 expression (Figure S3), and the number of positive cells per crypt was determined by counting the cells under the microscope (Figure 2). In WT mice, the number of proliferating cells significantly decreased by 50% 4 hours after irradiation and remained unchanged for the following 24 hours (Figure 2A). A clear and significant increase of cell proliferation was evident 48 hours after irradiation. As expected, the basal proliferative rate of crypt cells in  $TR\alpha^{0/0}$  mice was significantly lower than in the WT (Figure 2A), confirming our previous data (11). This low proliferation rate remained unaltered over the time of observation. Finally, no clear-cut increase in the number of proliferating progenitors has been observed 48 hours after irradiation.

Next we analyzed the number of apoptotic cells (Figure 2B). In the WT as well as in  $TR\alpha^{0/0}$  animals, there were no cleaved-caspase 3 positive cells in crypts in untreated condition. This was coherent with published data (15). However, after the irradiation the kinetics of apoptosis in the crypts of animals of the two genotypes was strongly different. WT crypt cells displayed a peak of apoptosis 8 hours after irradiation, and then the number of apoptotic cells significantly decreased over the time. Surprisingly,  $TR\alpha^{0/0}$  mice showed a strong increase in the number of cleaved-caspase 3 positive cells 4 hours after irradiation. However, in contrast to the wild

type, this level remained very high over the 48 hours of observation (Figure 2B).

To correlate the data obtained at cellular level, we analyzed the expression of markers of cell cycle arrest like p21, and cell cycle progression like cyclin D1. The levels of these two proteins were studied by WB and quantified by densitometry (Figure 2C). p21 amount was undetectable in control condition of both WT and  $TR\alpha$  mutants. In WT the level significantly increased 4 hours after irradiation, remained high at 8 hours and then declined. In  $TR\alpha^{0/0}$  mice the induction of p21 at 4h was lower than in the WT. Moreover, the level of the protein continued to increase at 8h and 48h after irradiation. Cyclin D1 expression level inversely correlated with those of p21, but were generally lower in the  $TR\alpha$  mutant at almost all time points analyzed. Despite these differences at the protein level, we couldn't observe any difference in the kinetics of p21 (Figure S4) and Cyclin D1 (not shown) mRNA expression in  $TR\alpha^{0/0}$  compared to the WT mice.

To check whether there was a difference in the kinetics of removal of cells displaying DNA damage in  $TR\alpha^{0/0}$  mice compared to the WT, we analyzed the expression of the phospho-H2A.X protein, a well characterized sensor of DNA damage (16). We have analyzed the number of positive cells by an IHC approach on tissue slides (Figure 3 A-H), and counted them under the microscope (quantification illustrated in Figure 3I). A few scattered positive nuclei were present in crypts and in lamina propria cells in both WT and  $TR\alpha^{0/0}$  animals in non-irradiated controls (Figure 3 A,E). Four hours after irradiation this number greatly increased in both genotypes (Figure 3 B,F). However, looking at 48h after irradiation it was clear that a higher number of p-H2A.X positive cells was present in  $TR\alpha^{0/0}$  crypts compared to the WT (Figure 3 G,H vs C,D). Figure 3I summarizes the counting of the p-H2A.X positive cells. This clearly shows that in  $TR\alpha^{0/0}$  crypt there is almost the double of positive cells compared to the WT mice 48h after irradiation. This difference is statistically significant. This was not due to a defect in the expression of the genes involved in DNA repair such as Mlh1, Msh1 and Msh2 (data not shown).

Altogether, the morphological feature of the  $TR\alpha^{0/0}$  small intestine crypts, 48 hours after

irradiation, can be explained both by a high level of apoptosis and a low level of proliferation, resulting in a delay of the regeneration of the intestinal mucosa.

#### *p53 activation cascade*

p53 is the key effector of the DNA-damage sensing pathway (scheme in Figure S1). Then we monitored its expression as well as that of proteins that directly or indirectly control its activation. We first monitored the mRNA level of p53 by RT-QPCR. Its expression was not significantly modified by  $\gamma$ -ray irradiation, either in WT or in TR $\alpha^{0/0}$  mice during the whole analysis (Figure S4). These data are coherent with the fact that the activation of p53 goes through the phosphorylation of the pre-existing protein (9, 17).

We then analyzed the expression of p53 protein in crypt cells by an IHC approach. The p53 positive cells in crypts were counted under the microscope and the results reported in Figure 4A. The kinetics of p53 positive cells during regeneration overlaps with that of apoptotic cells in both WT and TR $\alpha$  mutants, clearly showing a persistence of p53-positive cells in TR $\alpha^{0/0}$  irradiated intestine.

These changes correlate with the overall level of expression of p53 in the whole intestinal mucosa as assessed by Western blot analysis and quantified by densitometry (Figure 4B). In the WT small intestine, the level of p53 was almost undetectable at the baseline. Then it started increasing after 4h, reached a peak at 8h after irradiation and then declined greatly toward the basal level. Interestingly, in TR $\alpha^{0/0}$  intestine the basal level of p53 was significantly higher than in the WT, remained stable until 8h, reached a peak at 24h and started decreasing at 48h but it was still significantly higher compared to the WT at the same time point. Some discrepancies with the results obtained by microscopy can be due to the tissue heterogeneity in the lysates from the whole intestine.

We have considered the possibility that the different amounts of total p53 in the two genotypes could depend on different levels of the phosphorylated Mdm2 (serine 166). It is worth pointing out that phospho-Mdm2 protein is the active form that binds to p53 and targets its degradation through the proteasome (18). However, by using western blot and IHC approaches we failed to see any significant difference in the phospho-Mdm2 protein

expression in the two genotypes during the whole experiment (data not shown).

We also analyzed the expression of phospho-p53 (serine 15), which represents the active form of p53 (9, 17). The results are illustrated in Figure 4B. Phospho-p53 is detectable in irradiated WT mice after 4h, its level increased at 8h and then dropped. In TR $\alpha^{0/0}$  animals the phospho-p53 became detectable 8h after irradiation and then its level slightly decreased. However, the protein was still present at 48 hours in these animals in contrast to the WT (Figure 4B, compare lanes 48h).

The sustained expression of the phosphorylated active form of p53 in the intestine of the TR $\alpha^{0/0}$  animals is then thought to be the cause of the higher apoptosis rate in these mice 48h after irradiation.

Finally we analyzed at mRNA and protein levels the expression of the protein kinases involved in the Ser15-phosphorylation of p53. However, we couldn't observe any major difference in the levels of Chk1, Chk2, ATM, and ATR in the TR $\alpha^{0/0}$  compared to the WT mice at all time points analyzed (not shown). It has been reported that DNA-PKcs is one of the key protein quickly recruited on DNA after damage. It phosphorylates p53 on serine-15 (19). In order to evaluate whether the expression of DNA-PKcs was altered in TR $\alpha^{0/0}$  compared to the wild type mice, we performed RT-QPCR experiments (Figure 5A). In WT animals there was a clear-cut and significant increase of the DNA-PKcs mRNA 4 hours after irradiation. Then the amount decreased at the basal levels. In TR $\alpha^{0/0}$  animals, we could observe a similar and significant increase of the DNA-PKcs mRNA 4 hours after irradiation. However, the levels remained high and almost unchanged until 24h after irradiation. Interestingly, when we looked at the expression of DNA-PKcs at protein level in crypt cells by using an IHC approach, we could also detect qualitative and quantitative differences in the two genotypes (Figure 5 B-K). In both WT and TR $\alpha^{0/0}$  animals in control condition, we observed a few DNA-PKcs positive cells, sometimes clearly in non-epithelial cells (Figure 5 B,G). 8h after irradiation there was a clearcut increase in DNA-PKcs positive cells mostly in crypts in the two genotypes (Figure 5 C,D,H,I). The scoring of the number of DNA-PKcs positive cells per crypt under the microscope indicated

a similar result in the animals of the two genotypes (WT:  $3.2 \pm 0.79$ , N=30; TR $\alpha^{0/0}$ :  $3.6 \pm 0.84$ , N=30). However, it was clear that in TR $\alpha^{0/0}$  mutants the number of DNA-PKcs positive cells remained high at 48h compared to the WT animals (Figure 5 J,K vs E,F). Moreover, the counting under the microscope indicated that this difference was statistically significant (WT:  $0.7 \pm 0.48$ ; TR $\alpha^{0/0}$ :  $2.3 \pm 0.67$ .  $P < 0.01$  by Student T-test, N=30).

Altogether, this data strongly suggested a shift in p53 protein phosphorylation after irradiation of TR $\alpha^{0/0}$  mice, which correlates with the persistence of apoptotic cells in the crypts and the delayed regeneration of the tissue.

## Discussion

The thyroid hormone receptors, TRs, play multiple roles during post-embryonic development and physiological homeostasis. They are encoded by TR $\alpha$  and TR $\beta$  genes and are widely expressed throughout the tissues (20). The control by TRs of postnatal organ/tissue maturation has been compared to the multiple remodelling programs taking place during amphibian metamorphosis (5). So it might be expected that TRs could play some role in tissue repair and regeneration in adults, after insults such as irradiation.

The thyroid hormones are involved in several cellular responses such as cell proliferation, cell differentiation and apoptosis (1). In the small intestine of mice with altered TH/TR pathway, we have extensively documented their major role in epithelial cell proliferation (4). In these same models, we had also analyzed the levels of apoptosis. However, we failed to distinguish any difference between hypothyroid and/or TR $\alpha^{0/0}$  animals compared to the euthyroid WT (our unpublished observations). In the present work we show that intestinal injury induced by  $\gamma$ -ray leads to a sustained apoptotic response in crypt cells of TR $\alpha$  mutant mice. These data show that TR $\alpha$  controls the apoptosis only upon stress-induced tissue injury. Along the same lines, a role of TH in rat liver regeneration after partial hepatectomy has also been illustrated. This involves a negative control of apoptosis and the activation of cell proliferation to accelerate liver cellularity (21).

It has been widely documented that the regeneration of the intestinal epithelium after irradiation implies both a rapid cell death to eliminate cells with high DNA damage, and a proliferation burst to refill the crypt compartment (7, 8). Looking at the kinetics of cell apoptosis and cell proliferation, it is clear that the regeneration properties of the TR $\alpha^{0/0}$  animals are much different from that of the WT. First of all, TR $\alpha$  mutants do not respond to high DNA damage with a clearcut reduction of cell proliferation. One explanation could be that the cell cycle in those animals, even under control conditions, is already very slow. Second, the apoptotic step is longer, probably due a defect in the DNA-damage sensing, as suggested by our results. Altogether, the slow proliferation rate and the sustained apoptosis 24h-48h after irradiation in TR $\alpha^{0/0}$  animals would explain their impaired epithelial regeneration as compared to the WT.

Tissue repair following stress-induced injury is largely controlled by the p53 pathway (9, 17). The cellular levels of the p53 are maintained constant by a negative regulatory loop. The Mdm2 protein binds to p53 and targets its degradation via the proteasome (22). In turn, the Mdm2 gene is directly regulated by p53 (23). It is worth pointing out that the Mdm2 gene expression has also been shown to be controlled by TH. In fact, a thyroid hormone response element is located in the first intron of the gene, near to the p53 response element (24). However, when we looked at the expression of the Mdm2 at mRNA level, we couldn't observe any difference in the TR $\alpha$  mutants compared to the WT animals (data not shown). A possible explanation is that TR $\alpha$  plays a secondary role in controlling the expression of this gene via the enhancer in the intron 1, in response to DNA damage.

One important observation in our study is that p53 protein but not mRNA levels, were higher in the intestine of the TR $\alpha^{0/0}$  animals compared to the WT in control condition. As this was not due to differences in the expression of its main controller Mdm2, other factors must be involved.

It has been shown that p53 and the TR $\beta$ 1 physically interact in vitro. This leads to the inhibition of the transactivation activities of both TR $\beta$ 1 and p53 on their respective target genes (25, 26). No data are available

concerning a cross-talk between TR $\alpha$ 1 and p53 protein. However, several observations rule out such a possibility in intestinal epithelial progenitors. Since the mRNA levels of p53 direct targets (i.e. p21, Bax, Figure S4) were not increased in TR $\alpha^{0/0}$  mice, it is unlikely that TR $\alpha$ 1 and p53 inhibit each other through functional interaction. We can exclude any involvement of TR $\beta$ , as crypt cells express only the products of the TR $\alpha$  gene (our unpublished data).

p53 is activated by several cellular stresses, such as irradiation-induced DNA damage (9, 17). This results in the activation of several kinases comprising DNA-PKcs, ATM, Chk1 and Chk2, which in turn phosphorylate the pre-existing p53 (9). DNA-PKcs forms a platform on the broken DNA to ensure the assembly of a multiprotein complex allowing DNA repair and phosphorylates p53 on serine 15 thereby activating it (19). DNA damage-dependent recruitment of DNA-PKcs is supposed to be a process involving post-translational modifications such as phosphorylation (19).

An interesting, even surprising, observation was that a few hours after irradiation there was an increase in the levels of DNA-PKcs mRNA. This suggests that DNA damage signals also via the activation of DNA-PKcs transcription. However, since both WT and TR $\alpha$  mutant mice respond similarly, we can exclude the possibility that the up-regulation of the mRNA depends on the TR $\alpha$  gene. On the other hand, the fact that the levels of the mRNA and the protein remained high in the TR $\alpha^{0/0}$  animals, suggests that the TR $\alpha$  gene can play a role in its repression. However, this control is indirect as we couldn't observe any regulation of the DNA-PKcs mRNA in WT mice with altered TH status, or in intestine epithelium primary cultures treated with T3 (data not shown).

In conclusion, the TR $\alpha$  gene is involved in the regeneration of the intestinal epithelium, both by allowing fast elimination of damaged cells through apoptosis and by enhancing the proliferation of surviving progenitors. This control might reside at very early steps of DNA damage-dependent signalling, through as yet undefined mechanisms. Such a regeneration model would be valuable in identifying novel functions of the TR $\alpha$  gene.

Finally, these data might be of therapeutic interest for patients who undergo abdominal radiotherapy. Tissue complications caused by radiation-induced intestine stem cell depletion may result in structural and functional alterations of the gastrointestinal tract. It would therefore help to have a better understanding of the regeneration process on the intestine as mediated by TH after irradiation.

## Materials and Methods

### *Animal treatment and tissue preparation*

We used 16-week old female TR $\alpha^{0/0}$  mice, lacking the expression of the TR $\alpha$  gene (27), as well as WT female animals having the same genetic background. The mice were housed and maintained with approval from the animal experimental committee of the Ecole Normale Supérieure de Lyon (Lyon, France), and in accordance with European legislation on animal care and experimentation. The animals received 8 Gy of whole-body irradiation, using a  $^{137}$ Cesium  $\gamma$ -source (dose rate, 0,67 Gy/min). For the analysis of cell proliferation rate, 30 minutes before the sacrifice the animals were injected with 100  $\mu$ l of 4 mg/ml of BrdU solution in PBS. Animals were sacrificed at the indicated time points after irradiation and the intestine was quickly removed. The proximal and the distal part of the small intestine were fixed in 4% of paraformaldehyde for the histology and the immunohistochemistry, or frozen in liquid nitrogen and used for RNA and/or protein extraction. The protocol for mice irradiation was approved by the Regional Committee for the animal experimentation (CREEA, N° of agreement 087). Under the recommendations of this committee, the irradiated mice were sacrificed no later than 48 hours after irradiation to avoid any long term suffering.

### *Immunostaining*

Paraffin sections (5  $\mu$ m thickness) were used for indirect immunostaining. Briefly, sections were deparaffined in methylcyclohexane for 10 minutes, hydrated in ethanol, and washed with PBS. Slides were then subjected to antigen retrieval, using microwave heating in 0.01M citrate buffer pH 6, and incubated for one hour at room temperature with blocking buffer (10% normal goat serum, 1% BSA and 0.02 Triton-X 100 in PBS). The slides were

incubated with primary antibodies over-night at 4°C followed by incubation with fluorescent anti-mouse or anti-rabbit antibodies (Jackson Laboratories). All nuclei were stained with Hoechst (Sigma). For the immunohistochemical approach, we used the Histomouse kit (Zymed Laboratories). Fluorescence and bright-field microscopy was performed on a Zeiss Axioplan microscope. To quantify the number of immunolabelled cells, they have been counted under the microscope on well-oriented sections from at least 3 different animals per experimental condition.

#### *Western blotting*

Whole-protein extracts were obtained by homogenizing mouse small intestine in RIPA buffer (Tris pH 7.4 50mM, NaCl 150mM, PMSF 1mM, EDTA 1mM, Aprotinin 5µg/mL, Leupeptine 5µg/mL, Triton X-100 1%, Sodium deoxyolate 1%, SDS 0,1%, Protease Inhibitors 40 µL/mL). Proteins (50 µg per lane) were separated on 8 or 10% acrylamide-bis acrylamide (29:1) gel and transferred to a nitrocellulose membrane (Hybond ECL) before saturation and incubation with the first antibody. This was followed by incubation with secondary anti-rabbit or anti-mouse IgG-horseradish peroxidase (Promega). The signal was analyzed using the enzymatic chemiluminescence detection kit (LumiLight, Roche).

#### *Antibodies*

For the immunolabelling on sections or WBs we used the following antibodies: anti-BrdU (Amersham, reconstituted with the nuclease buffer and used undiluted); anti-cleaved caspase-3 (diluted 1:100), anti-phospho-p53 (Ser15) (diluted 1:500), anti-phospho-Mdm2 (Ser166) (diluted 1:50 for IF and 1:100 for WB), anti-phospho-Chk2 (Thr387) (diluted 1:500), anti-phospho-ATM (Ser1981) (diluted 1:500) (Cell Signaling Technology); anti-

cyclin D1 (Lab Vision, diluted 1:500); anti-p53 (diluted 1:50 for IF and 1:200 for WB), anti-p21 (diluted 1:500), anti-DNA PKcs (diluted 1:50 for IF and 1:200 for WB) (Santa Cruz Biotechnology, Inc); anti-phospho-histone H2A.X (Upstate, diluted 1:50).

#### *RNA extraction and analysis*

RNA was extracted from tissues using the QIAGEN RNeasy kit (Qiagen). To avoid the presence of contaminating DNA, DNase digestion was performed in all preparations. Reverse transcription was performed using MuMLV reverse transcriptase (Promega) on 1 µg of total RNA according to the manufacturer's instructions using random hexanucleotide priming (Invitrogen). QPCR analyses were performed with SYBR green PCR master mix (Qiagen) in a MXP3000 apparatus (Stratagene). The data from the PCR were normalized to that of 36B4 levels in each sample. The primers used are listed in Supplementary table 1.

#### *Statistics*

Numerical results (graphs) are presented as means  $\pm$  standard deviation. Groups were compared by using the two-tailed Student T-test, with  $P < 0.05$  considered significant.

#### **Acknowledgments**

We gratefully acknowledge Nadine Aguilera for animal handling. The histological analyses were performed by the Anipath platform of Rhône-Alpes Genopole. This work was supported by the Agence Nationale pour la Recherche (grant ANR-06-BLAN-0232-01) and the program Equipe Labellisée of the Ligue Nationale contre le Cancer. EK and AR studentships are supported by the Ligue Nationale contre le Cancer. MP is supported by INSERM.

## References

1. Lewis, Roberts The Thyroid, A Fundamental and Clinical Text. 8th ed. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins
2. Laudet V, Hanni C, Coll J, Catzeflis F, Stehelin D 1992 Evolution of the nuclear receptor gene superfamily. *The EMBO journal* 11:1003-1013
3. Flamant F, Gauthier K, Samarut J 2007 Thyroid hormones signaling is getting more complex: STORMs are coming. *Mol Endocrinol* 21:321-333
4. Plateroti M, Kress E, Samarut J 2007 Specific actions of thyroid hormones during gut development: insights from animal models. *Journal of pediatric endocrinology & metabolism* 20:119-122
5. Shi YB, Wong J, Puzianowska-Kuznicka M, Stelow MA 1996 Tadpole competence and tissue-specific temporal regulation of amphibian metamorphosis: roles of thyroid hormone and its receptors. *Bioessays* 18:391-399
6. Stappenbeck TS, Wong MH, Saam JR, Mysorekar IU, Gordon JI 1998 Notes from some crypt watchers: regulation of renewal in the mouse intestinal epithelium. *Curr Opin Cell Biol* 10:702-709
7. Potten CS, Booth C 1997 The role of radiation-induced and spontaneous apoptosis in the homeostasis of the gastrointestinal epithelium: a brief review. *Comparative biochemistry and physiology* 118:473-478
8. Potten CS 2004 Radiation, the ideal cytotoxic agent for studying the cell biology of tissues such as the small intestine. *Radiation research* 161:123-136
9. Helton ES, Chen X 2007 p53 modulation of the DNA damage response. *J Cell Biochem* 100:883-896
10. Potten CS, Owen G, Booth D 2002 Intestinal stem cells protect their genome by selective segregation of template DNA strands. *Journal of cell science* 115:2381-2388
11. Plateroti M, Kress E, Mori JI, Samarut J 2006 Thyroid hormone receptor alpha1 directly controls transcription of the beta-catenin gene in intestinal epithelial cells. *Molecular and cellular biology* 26:3204-3214
12. Plateroti M, Gauthier K, Domon-Dell C, Freund JN, Samarut J, Chassande O 2001 Functional interference between thyroid hormone receptor alpha (TRalpha) and natural truncated TRDeltaalpha isoforms in the control of intestine development. *Molecular and cellular biology* 21:4761-4772
13. Flamant F, Poguuet AL, Plateroti M, Chassande O, Gauthier K, Streichenberger N, Mansouri A, Samarut J 2002 Congenital hypothyroid Pax8(-/-) mutant mice can be rescued by inactivating the TRalpha gene. *Mol Endocrinol* 16:24-32
14. Kerr JFR, Gobe G, Winterford C and Harmon B 1995 Anatomical methods in cell death. In: Schwartz LM and Osborne BA (eds) *Methods in cell Biology* (46): Cell death pp. 1-27, San Diego: Academic Press
15. Wilson JW, Pritchard DM, Hickman JA, Potten CS 1998 Radiation-induced p53 and p21WAF-1/CIP1 expression in the murine intestinal epithelium: apoptosis and cell cycle arrest. *Am J Pathol* 153:899-909
16. Lukas J, Lukas C, Bartek J 2004 Mammalian cell cycle checkpoints: signalling pathways and their organization in space and time. *DNA Repair (Amst)* 3:997-1007
17. Liu Y, Kulesz-Martin M 2001 p53 protein at the hub of cellular DNA damage response pathways through sequence-specific and non-sequence-specific DNA binding. *Carcinogenesis* 22:851-860
18. Khosravi R, Maya R, Gottlieb T, Oren M, Shiloh Y, Shkedy D 1999 Rapid ATM-dependent phosphorylation of MDM2 precedes p53 accumulation in response to DNA damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:14973-14977
19. Burma S, Chen DJ 2004 Role of DNA-PK in the cellular response to DNA double-strand breaks. *DNA repair* 3:909-918
20. Flamant F, Samarut J 2003 Thyroid hormone receptors: lessons from knockout and knock-in mutant mice. *Trends Endocrinol Metab* 14:85-90



21. Alisi A, Demori I, Spagnuolo S, Pierantozzi E, Fugassa E, Leoni S 2005 Thyroid status affects rat liver regeneration after partial hepatectomy by regulating cell cycle and apoptosis. *Cell Physiol Biochem* 15:69-76
22. Woods DB, Vousden KH 2001 Regulation of p53 function. *Exp Cell Res* 264:56-66
23. Barak Y, Juven T, Haffner R, Oren M 1993 mdm2 expression is induced by wild type p53 activity. *The EMBO journal* 12:461-468
24. Qi JS, Yuan Y, Desai-Yajnik V, Samuels HH 1999 Regulation of the mdm2 oncogene by thyroid hormone receptor. *Molecular and cellular biology* 19:864-872
25. Yap N, Yu CL, Cheng SY 1996 Modulation of the transcriptional activity of thyroid hormone receptors by the tumor suppressor p53. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93:4273-4277
26. Bhat MK, Yu C, Yap N, Zhan Q, Hayashi Y, Seth P, Cheng S 1997 Tumor suppressor p53 is a negative regulator in thyroid hormone receptor signaling pathways. *The Journal of biological chemistry* 272:28989-28993
27. Gauthier K, Plateroti M, Harvey CB, Williams GR, Weiss RE, Refetoff S, Willott JF, Sundin V, Roux JP, Malaval L, Hara M, Samarut J, Chassande O 2001 Genetic analysis reveals different functions for the products of the thyroid hormone receptor alpha locus. *Molecular and cellular biology* 21:4748-4760

### Figure Legends

Figure 1. Analysis of WT and TR $\alpha^{0/0}$  small intestine morphology after 8 Gy  $\gamma$ -ray irradiation. Pictures show Hematoxylin & Eosine staining of paraffin sections of WT (A-E) or TR $\alpha^{0/0}$  (F-J) small intestine. The intestinal morphology has been studied in non irradiated mice (A,F) or in mice 24 (B,C,G,H) or 48 hours after irradiation (D,E,I,J).

Abbreviations: ve, villus epithelium; ce, crypt epithelium; ct, connective tissue; ml, muscle layers. The red dotted bars define the limit between the crypts and the villi compartments. Some crypts (yellow dots) are highlighted in panel A. The arrows in B,G,I point to the ghost of apoptotic cells. Bars: A,B,D,F,G,I= 15  $\mu$ M; C,E,H,J= 7  $\mu$ M.

Figure 2. Follow-up of cell proliferation and apoptosis in intestinal crypt cells after irradiation. A) Number of proliferating and B) number of apoptotic cells in WT and TR $\alpha^{0/0}$  crypts at different time points after 8 Gy  $\gamma$ -irradiation. Proliferation and apoptosis have been studied by respectively BrdU and cleaved-caspase 3 immunolabelling. The number of positive cells per crypt for each marker has been counted under a Zeiss Axioplan microscope on well-oriented sections from 3 animals per experimental group. 30 crypts per experimental condition have been evaluated under the microscope. Histograms illustrate means  $\pm$  standard deviations. C) Western blot analysis of the indicated proteins in the whole intestine lysate of WT or TR $\alpha^{0/0}$  animals, at different time points after irradiation. The blot is representative of 3 independent experiments. Each lane represents pooled extracts from 2 animals (50  $\mu$ g/lane). Actin has been used as loading control. Histograms in the lower panels (means  $\pm$  standard deviations) summarize densitometry analyses (by ImageQuant software) from three independent experiments. Data are normalized by the amount of actin in each sample.

\*: P<0.05 and \*\*: P<0.01 by Student T-test. When not indicated, the comparisons have been realized with the preceding time point. #: P<0.05 and ##: P<0.01 by Student T-test, compared with the WT at the same time point.

Figure 3. Follow-up of DNA damage in the intestine after irradiation. Paraffin sections were from intestine of WT (A-D) or TR $\alpha^{0/0}$  (E-H) in control (A,E), 4h (B,F) and 48h after irradiation (C,D,G,H). DNA damage have been revealed by the pH2A.X immunolabelling. I) Quantification of the pH2A.X positive cells in intestinal crypts. The number of positive cells per crypt has been counted under a Zeiss Axioplan microscope on well-oriented sections from 3 animals per experimental group. 30 crypts per experimental condition have been evaluated under the microscope. Histograms illustrate means  $\pm$  standard deviations. Abbreviations: ve, villus epithelium; ce, crypt epithelium; ml, muscle layer. The black dotted bars define the limit between the crypt and the villi compartments. The arrows in A and E point to few scattered positive cells. Bars: A,B,D,E,F,H= 15  $\mu$ M; C,G= 40  $\mu$ M.

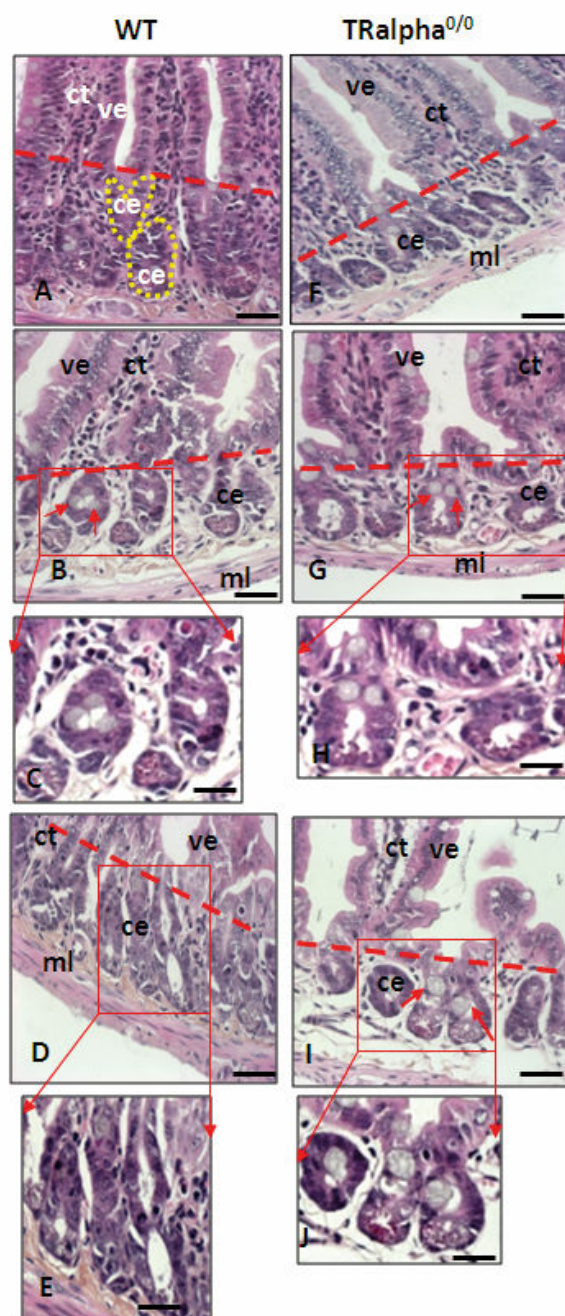
\*\*: P<0.01 by Student T-test. ##: P<0.01 by Student T-test, compared with the WT at the same time point.

Figure 4. Analysis of p53 protein expression after irradiation. A) Number of p53 positive cells per crypt in WT or TR $\alpha^{0/0}$  mice at different time points after irradiation. The positive immunolabelled cells have been counted under a Zeiss Axioplan microscope on well-oriented sections from 3 different animals per experimental condition. 30 crypts per experimental condition have been evaluated under the microscope. Histograms illustrate means  $\pm$  standard deviations. B) Western blot analysis of the indicated proteins in whole intestine lysates of WT and TR $\alpha^{0/0}$  animals, at different time points after irradiation. The blot is representative of 3 independent experiments. Each lane represents pooled extracts from 2 animals (50  $\mu$ g/lane). For loading control, membranes have been stained with Ponceau Red before incubation with the antibodies. The picture illustrates some representative protein bands. Histograms in the lower panels (means  $\pm$  standard deviations) summarize densitometry analyses (by ImageQuant software) from three independent experiments. Data are normalized by the amount of actin in each sample.

\*: P<0.05 and \*\*: P<0.01 by Student T-test. When not indicated, the comparisons have been realized with the preceding time point. #: P<0.05 and ##: P<0.01 by Student T-test, compared with the WT at the same time point.

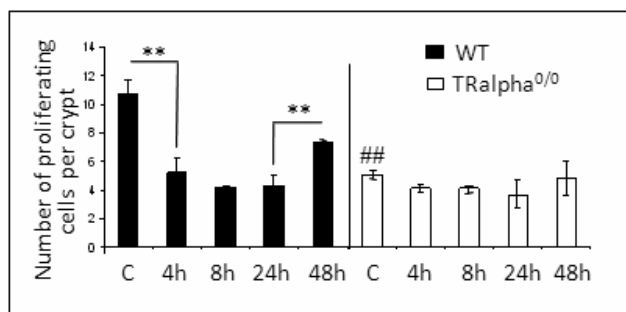
Figure 5. Analysis of DNA-PKcs expression after irradiation. A) Quantitative real-time RT-PCR analysis of DNA-PKcs mRNA in intestine of WT and TR $\alpha^{0/0}$  irradiated mice. The picture is representative of two independent experiments, using 3 animals per experimental condition. Histograms illustrate means  $\pm$  standard deviations. \*\*: P<0.01 by Student T-test. #: P<0.05 by Student T-test, compared with the WT at the same time point. B-K) Immunolabeling of DNA-PKcs on paraffin sections from WT (B-F) or TR $\alpha^{0/0}$  (G-K) mice. Intestinal sections have been studied in non irradiated mice (B,G), 8 hours after irradiation (C,D,H,I) or 48 hours after irradiation (E,F,J,K). Pictures show the merging of DNA-PKcs immunolabelled (red) and nuclear staining by Hoechst (blue). Abbreviations: ve, villus epithelium; ce, crypt epithelium; ml, muscle layers. The white dotted bars define the limit between the crypt and the villi compartments. The arrows in B and G point the DNA-PKcs positive cells. Bars: B,C,E,G,H,J= 15  $\mu$ M; D,F,I,K= 7  $\mu$ M.

Kress et al. Figure 1

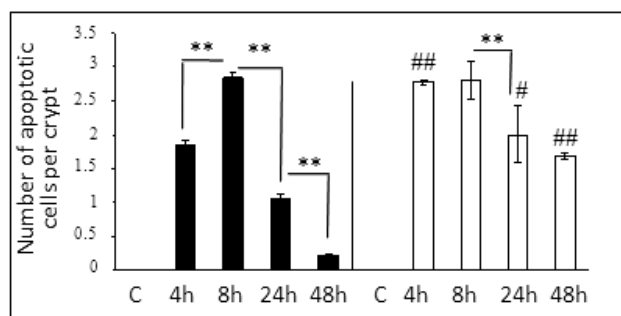


## Kress et al. Figure 2

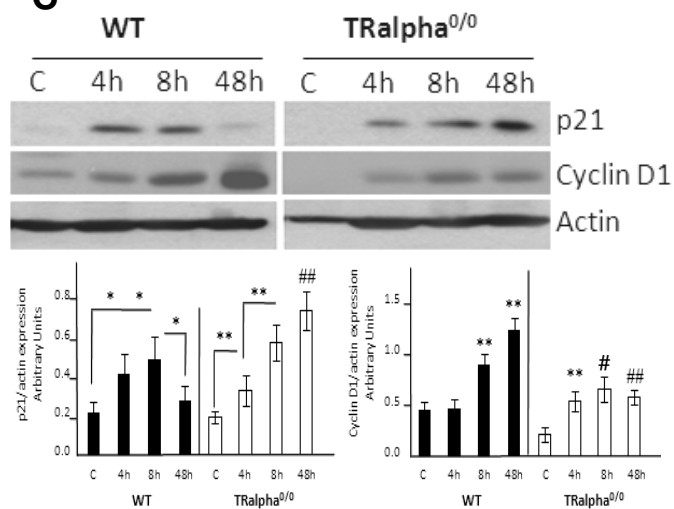
**A**



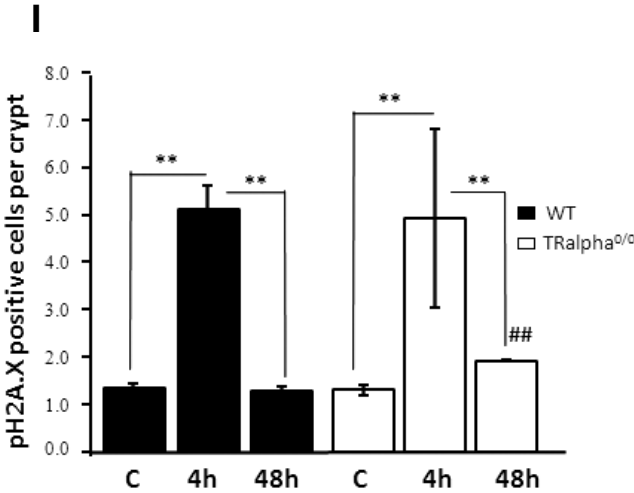
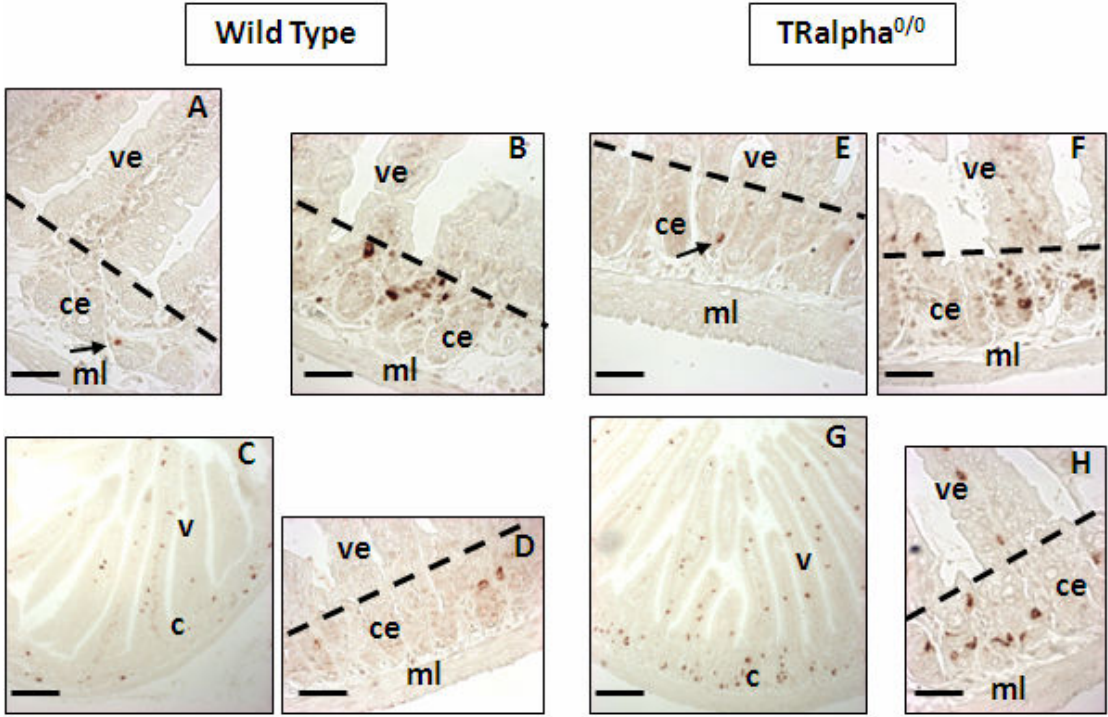
**B**



**C**

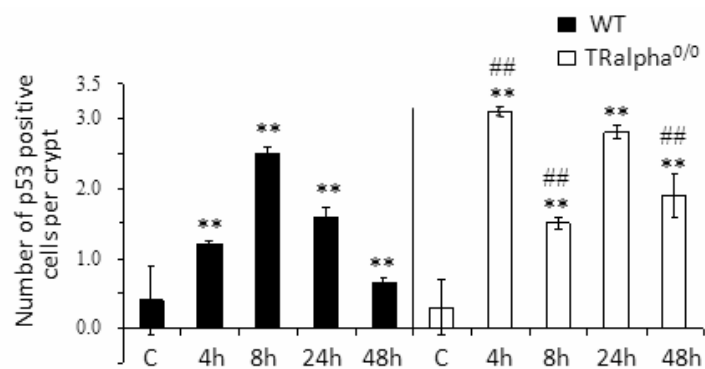


Kress et al. Figure 3

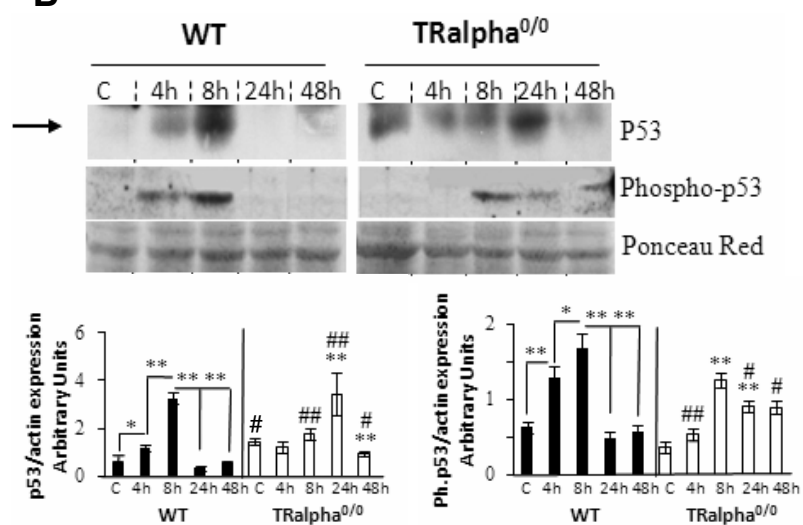


Kress et al. Figure 4

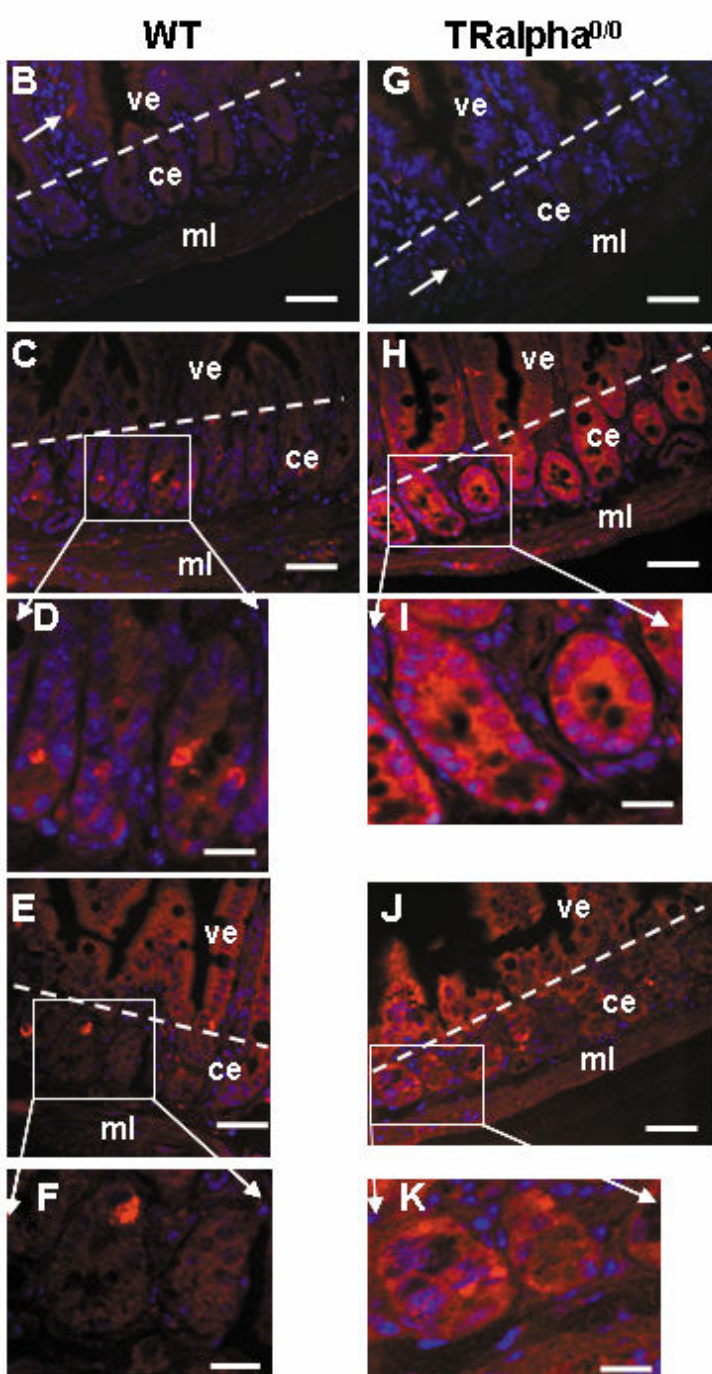
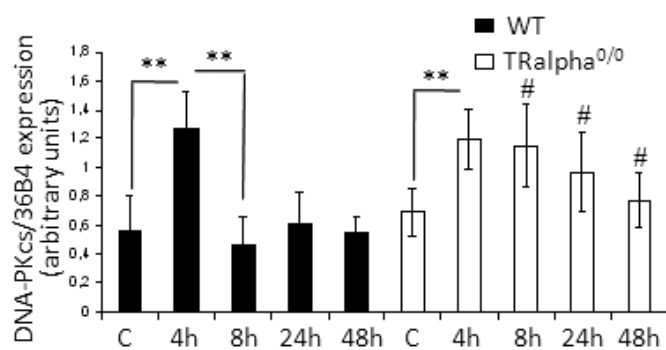
**A**



**B**

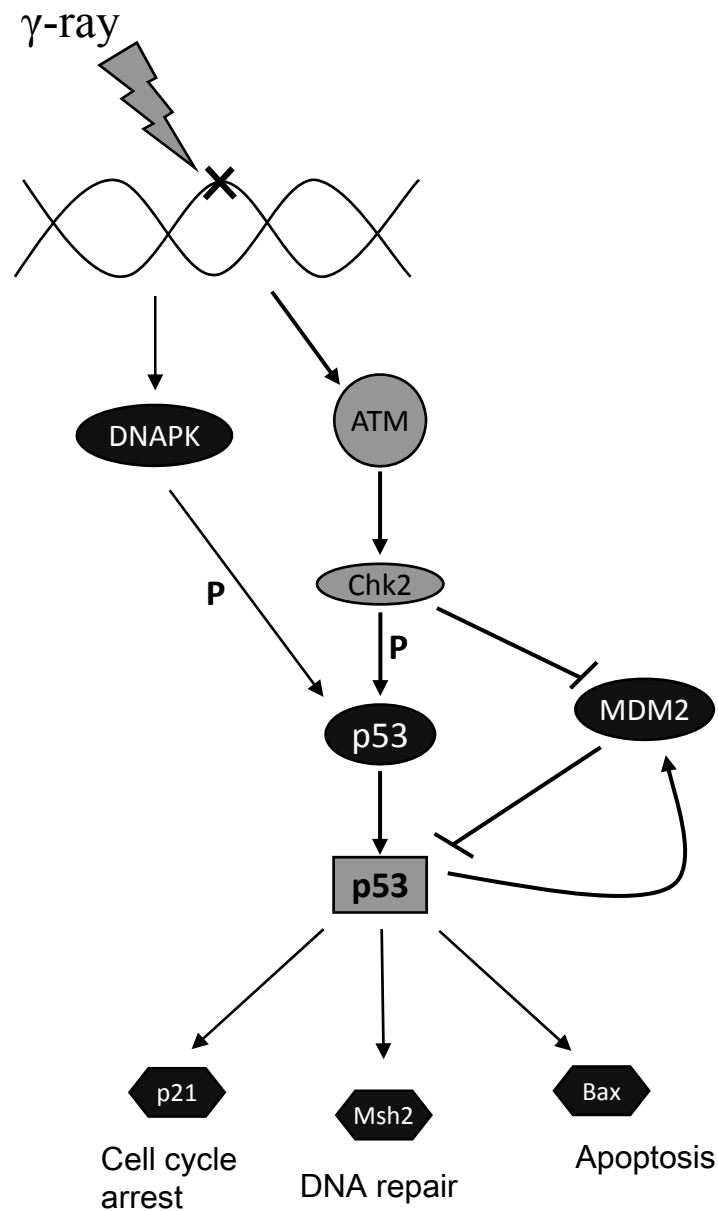


**A**



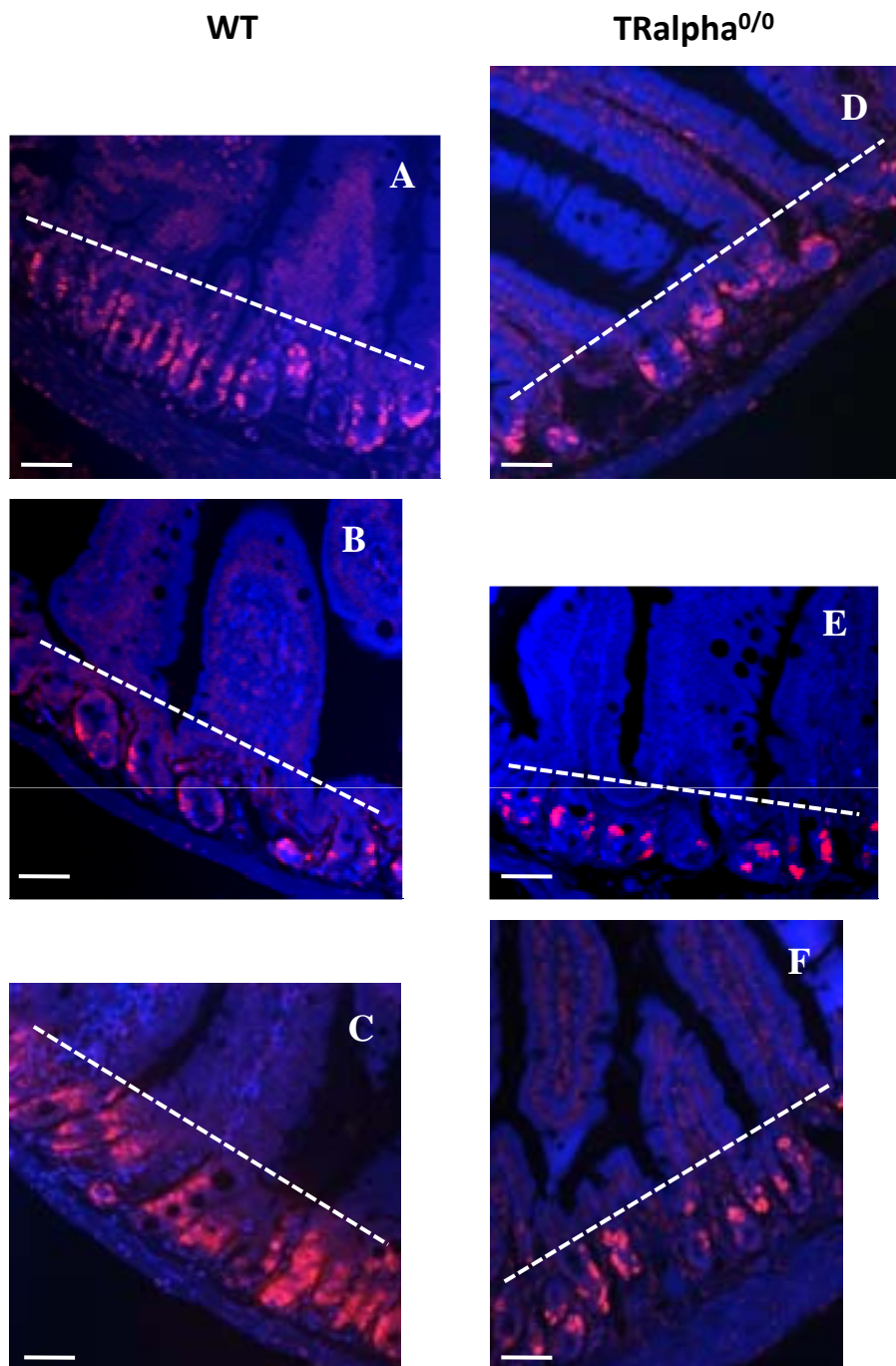


**Kress et al. Supplementary Figure 1**



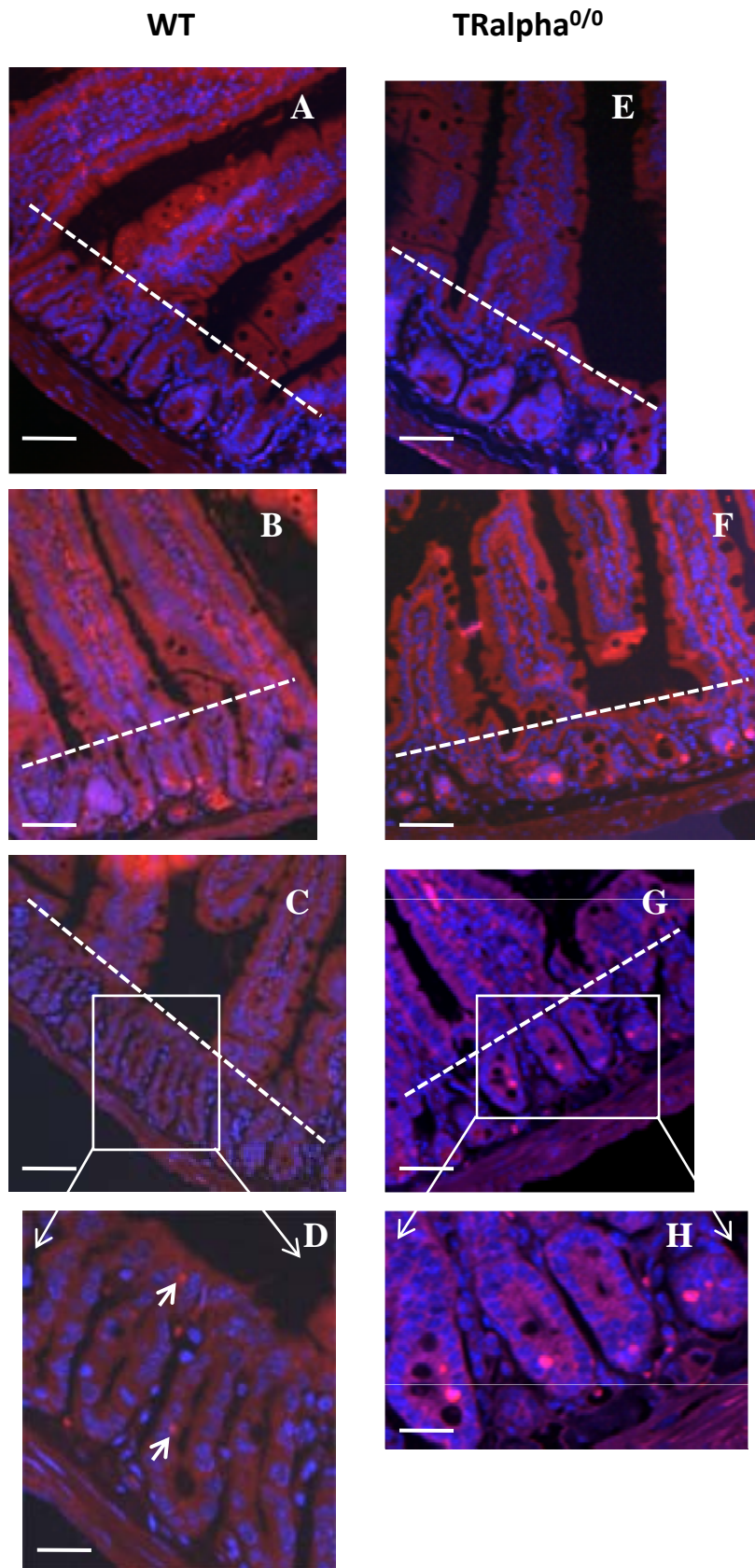
**Supplementary Figure 1.** Pathway of p53 activation after DNA damage by  $\gamma$ -irradiation. The p53 protein is activated by DNA damage through multiple post-translational modifications. The activation of p53 can lead to DNA repair, cell cycle arrest or apoptosis. The level of damaged DNA determinates the different responses.

Kress et al. Supplementary Figure 2



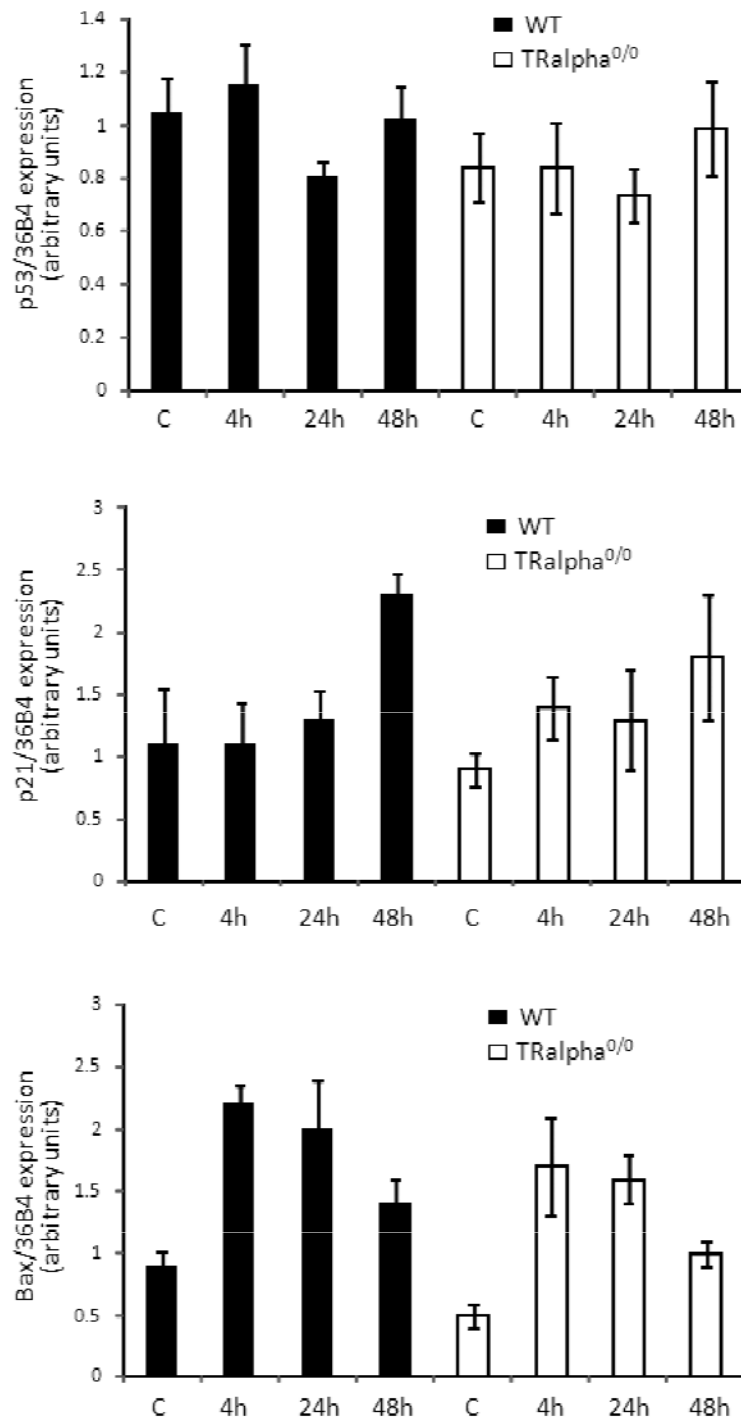
**Supplementary Figure 2.** Immunolocalization of proliferating cells in intestinal crypts by BrdU labeling. Paraffin sections were from WT (A-C) or TR $\alpha^{0/0}$  (D-F) animals in control condition (A,C), or 8h (B,E) and 48h (C,F) after irradiation. Pictures show the merging of BrdU immunolabeling (red) and nuclear staining by Hoechst (blue). The white dotted bars define the limit between the crypts and the villi compartments. Bars A-F= 15  $\mu$ m.

Kress et al. Supplementary Figure 3



**Supplementary Figure 3.** Immunolabeling of apoptotic cells by activated-caspase 3 antibody. Paraffin sections were from WT (A-D) or TR $\alpha^{0/0}$  (E-H) animals in control condition (A,E), or 8h (B,F) and 48h (C,D,G,H) after irradiation. Pictures show the merging of activated-caspase 3 immunolabeling (red) and nuclear staining by Hoechst (blue). The white dotted bars define the limit between the crypts and the villi compartments. Arrows in D point to rare activated-caspase 3 positive cells, as compared with the picture D showing 2-3 positive cells per crypt. Bars A-G= 15  $\mu$ m; D,H= 7  $\mu$ m.

#### Kress et al. Supplementary Figure 4



**Supplementary Figure 4** Analysis of gene expression after irradiation. Quantitative real-time RT-PCR analysis of p53, p21 and Bax mRNA in intestine of WT and TR $\alpha^{0/0}$  irradiated mice. The picture is representative of two independent experiments, using 3 animals per experimental condition. Histograms illustrate means  $\pm$  standard deviations.

## II. Deuxième article :

### **Comparative transcription profile of intestine epithelial progenitors reveals a complex interplay between the Thyroid hormone Receptor TR $\alpha$ 1 and the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway**

Elsa Kress, Amelie Rezza, Julien Nadjar, Jacques Samarut and Michelina Plateroti

Université de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, Ecole Normale Supérieure de Lyon, INRA, CNRS, Institut de Génomique Fonctionnelle de Lyon, Lyon, France

**Soumis à Genes & Development**

#### **Abstract**

The thyroid hormone receptor TR $\alpha$ 1 controls the intestinal epithelial cell proliferation via the activation of the canonical Wnt pathway. This suggests its potential role as tumor inducer. In order to analyze the global thyroid hormone target genes *in vivo*, we used here a comparative transcription profile approach on laser microdissected crypt cells. This study led to describe nearly 180 genes differentially regulated, and *in silico* analysis helped group them into organized functional networks. One of these networks dealt with “cell cycle/cell proliferation”. An interesting discovery was that a component of the Wnt pathway, the frizzled related protein sFRP2, was greatly increased by the hormonal treatment and directly regulated by TR $\alpha$ 1. The use of intestinal epithelium primary cultures led to show that sFRP2 behaves as an activator of the canonical Wnt in three ways: i) by stabilizing  $\beta$ -catenin, ii) by favouring the activation of its target genes, iii) by enhancing cell proliferation. This new data, in conjunction with our previous results, indicates the complex interplay between the TR $\alpha$ 1 and the canonical Wnt. Moreover, we describe a new mechanism of action of the hormone-stimulated sFRP2 in the activation of  $\beta$ -catenin, parallel to the paracrine Wnt signal.

L'analyse du phénotype des différents mutants des récepteurs aux hormones thyroïdiennes a montré que le gène *TRα* est un régulateur important de la prolifération des cellules épithéliales des cryptes intestinales. Plus particulièrement, le récepteur *TRα1* contrôle la prolifération des cellules épithéliales lors du sevrage chez la souris, mais également à l'âge adulte (Plateroti et al. 1999; Plateroti et al. 2001; Plateroti et al. 2006). La voie Wnt/ $\beta$ -caténine joue un rôle central dans la prolifération des cellules épithéliales, grâce à des gènes cibles comme les *cyclines* ou *c-myc*. Nous avons montré que *TRα1* et les HT régulent positivement et directement l'expression de  $\beta$ -caténine, et indirectement celle de ses gènes cibles (Plateroti et al. 2006). Cependant, il est généralement accepté que la seule augmentation de l'expression de  $\beta$ -caténine *per se* ne serait pas suffisante à l'activation des gènes cibles dans la mesure où il faut qu'elle soit activée et libérée du complexe répresseur APC/GSK3 $\beta$ /Axin.

Afin d'avoir une vue d'ensemble des réseaux de gènes contrôlés par les HT et les TR dans l'épithélium intestinal, nous avons choisi d'utiliser une approche transcriptomique. Comme nous nous intéressons au contrôle de la prolifération des cellules épithéliales, nous avons utilisé la technique de microdissection laser pour disséquer les cellules des cryptes intestinales. Nous avons travaillé sur des souris de deux semaines car à cet âge les cryptes sont pleinement formées mais ne contiennent pas encore de cellules de Paneth. Les cryptes ont été isolées à partir d'animaux sauvages contrôles ou hypo/hyperthyroïdiens, mais également d'animaux *TRα* KO ou *TRβ* KO. Afin d'avoir un échantillonnage statistiquement correct, chaque condition expérimentale était constituée de 3 pools correspondant chacun à deux animaux. Les ARN totaux récoltés ont été amplifiés puis hybridés sur des puces Affymetrix DNA GeneChip "Mouse Expression Array 430A 2.0".

Une fois les résultats des puces obtenus, nous avons comparé deux à deux les conditions expérimentales suivantes : WT-TH vs WT-C; WT-PTU vs WT-C; WT-TH vs WT-PTU; *TRα*<sup>0/0</sup> vs WT-C; *TRβ*<sup>-/-</sup> vs WT-C. Lors de l'analyse statistique des données, nous

n'avons gardé que les gènes soutenus par une p-value inférieure à 0,05 et avec une variation d'expression de plus de 50 %. Cela nous a amené à une liste finale de 179 gènes. Parmi ces gènes, 116 ont été testés en QPCR multiplex, et 75 % donnent le même résultat que les données des puces.

A partir de la liste de gènes initiale, nous avons réalisé une recherche de réseau de gènes, et nous avons pu mettre en évidence un réseau intitulé « cycle cellulaire et prolifération » qui regroupe 35 gènes, validés pour la plupart. Dans ce réseau se trouve un des gènes les plus fortement activé par les HT, *sFRP2*. Ce facteur sécrété est un régulateur de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine dans la mesure où sa structure est proche de celle du récepteur Fzd. Les données de la littérature indiquent que sFRP2 inhibe la voie Wnt/ $\beta$ -caténine (Kawano and Kypta 2003; Jones et al. 2006). Il y a cependant des études qui suggèrent un rôle de sFRP2 en tant qu'activateur de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine (Lee et al. 2003; Mirotsoy et al. 2007). Pour la suite de l'étude, nous avons décidé de nous focaliser sur sFRP2, afin de clarifier sa fonction dans les progéniteurs de l'épithélium intestinal.

Nous avons montré dans un premier temps, en utilisant les cultures primaires d'épithélium, que la régulation de l'expression de sFRP2 par la  $T_3$  est cellule-épithéliale autonome et directe. La régulation est présente également *in vivo*, au niveau protéique, dans la mesure où les fractions prolifératives de l'épithélium de souris sauvages traitées aux HT sont enrichies en protéines sFRP2, par rapport à celles issues de souris non traitées. Une analyse *in silico* du gène *sFRP2* a mis en évidence la présence d'un TRE putatif dans le promoteur. Nous avons montré par précipitation de chromatine que TR $\alpha$ 1 se fixe bien sur cet élément de réponse en présence de  $T_3$ .

Une fois établi que l'expression de sFRP2 est bien régulée positivement par les HT, nous avons cherché à comprendre son rôle dans le contrôle de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine. Toujours en travaillant sur le modèle des cultures primaires de cellules épithéliales, nous

avons montré que les gènes cibles de  $\beta$ -caténine (*c-myc* et *ccnd1*) sont activés par la protéine recombinante sFRP2. Il s'agit d'une activation spécifique de sFRP2 puisque les cellules traitées à la  $T_3$  et avec un anticorps dirigé contre sFRP2 ont un niveau de *c-myc* similaire aux cellules non traitées. L'activation des gènes cibles de  $\beta$ -caténine est bien la conséquence de l'activation de  $\beta$ -caténine, dans la mesure où l'on peut observer une augmentation du nombre de cellules où elle est présente dans le noyau. De plus, les cellules exprimant  $\beta$ -caténine dans le noyau sont des cellules en prolifération. La prolifération des cellules épithéliales est conjointe à la présence de  $\beta$ -caténine dans le noyau. La corrélation entre le traitement par les HT, l'augmentation de l'activation de la  $\beta$ -caténine et la prolifération des cellules des cryptes intestinales a été confirmée *in vivo*

Nous avons donc mis en évidence un rôle nouveau de sFRP2 dans la régulation i) de l'activation de  $\beta$ -caténine ; ii) de l'activation de la prolifération épithéliale. Les implications de ces résultats dans le schéma global du contrôle de l'homéostasie de l'épithélium intestinal par les HT et les TR seront discutés dans la partie Discussion et Perspectives de ma thèse.



**Comparative transcription profile of intestine epithelial progenitors reveals a complex  
interplay between the Thyroid hormone Receptor TR $\alpha$ 1 and the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway**

Elsa Kress, Amelie Rezza, Julien Nadjar, Jacques Samarut and Michelina Plateroti\*

Université de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, Ecole Normale Supérieure de Lyon,  
INRA, CNRS, Institut de Génomique Fonctionnelle de Lyon, Lyon, France

\*: Corresponding Author.

Mailing address: Institut de Génomique Fonctionnelle de Lyon, Ecole Normale Supérieure de  
Lyon, 46 allée d'Italie, 69364 Lyon Cedex 07, France.

Tel: 33 472728536

Fax: 33 472728080

E-mail: [Michela.Plateroti@ens-lyon.fr](mailto:Michela.Plateroti@ens-lyon.fr)

Running title: Thyroid hormone and intestinal crypts

## Abstract

The thyroid hormone receptor TR $\alpha$ 1 controls the intestinal epithelial cell proliferation via the activation of the canonical Wnt pathway. This suggests its potential role as tumor inducer. In order to analyze the global thyroid hormone target genes *in vivo*, we used here a comparative transcription profile approach on laser microdissected crypt cells. This study led to describe nearly 180 genes differentially regulated, and *in silico* analysis helped group them into organized functional networks. One of these networks dealt with “cell cycle/cell proliferation”. An interesting discovery was that a component of the Wnt pathway, the frizzled related protein sFRP2, was greatly increased by the hormonal treatment and directly regulated by TR $\alpha$ 1. The use of intestinal epithelium primary cultures led to show that sFRP2 behaves as an activator of the canonical Wnt in three ways: i) by stabilizing  $\beta$ -catenin, ii) by favouring the activation of its target genes, iii) by enhancing cell proliferation. This new data, in conjunction with our previous results, indicates the complex interplay between the TR $\alpha$ 1 and the canonical Wnt. Moreover, we describe a new mechanism of action of the hormone-stimulated sFRP2 in the activation of  $\beta$ -catenin, parallel to the paracrine Wnt signal.

## **Introduction**

The thyroid hormones (TH), T<sub>3</sub> and T<sub>4</sub>, control multiple functions such as cell proliferation, cell differentiation and apoptosis depending on the tissue targets (Yen et al. 2006). This is well illustrated during amphibian metamorphosis (Tata 2006). The action of TH is mediated by T<sub>3</sub> binding to nuclear receptors, the TRs, belonging to the nuclear receptor family of transcription factors (Laudet et al. 1992). In fact, they can activate or repress transcription of target genes by binding to specific DNA sequences named Thyroid hormone Responsive Elements (TRE) (Yen et al. 2006). It has been reported that in several organs of the gastrointestinal tract TH-TRs stimulate the cell proliferation. This is well exemplified in rat liver and pancreas (Ledda-Columbano et al. 2005; Columbano et al. 2006) and in the mouse intestine (Plateroti et al. 1999; Plateroti et al. 2001; Plateroti et al. 2006) in normal condition as well as during regeneration process after partial hepatectomy (Alisi et al. 2005; Bockhorn et al. 2007) or after radiation-induced intestinal injury (Kress et al. 2007). These data point to the importance of TH in these organs and clearly suggest a careful survey in human, in relation to clinical and subclinical hypo- and hyperthyroidism (Wilson and Curry 2005; Papi et al. 2007). Several reports point to the involvement of mutant TRs in human cancers (Lin et al. 1999; Cheng 2003; Gonzalez-Sancho et al. 2003). This has also been extended to animal models (Cheng 2003). Data also show correlations between altered levels of TH and breast and colon cancers in human (Rose and Davis 1981), and between hyperthyroxinemia and the rate of colon cancer in a model of experimental carcinogenesis in the rat (Iishi et al. 1992). Moreover, it was shown that the absence (Markowitz et al. 1989), the mutation (Wang et al. 2002) or the aberrant expression (Horkko et al. 2006) of TRs can be associated with gastrointestinal tumors. However until now a clearcut demonstration of a link between their proliferative action and tumorigenesis is still lacking.

The intestinal epithelium is characterized by a continuous and rapid cell renewal, dependent upon adult stem cells located in the crypts of Lieberkühn (Stappenbeck et al. 1998). Progenitor cells proliferate in crypts and migrate. At the exit from the crypts they stop proliferate, differentiate and die by apoptosis at the apex of villi (Clatworthy and Subramanian 2001). The whole process lasts three/four days in the mouse (Karam 1999). Several factors control intestinal epithelial continuous cell renewal, such as intrinsic (i.e. transcription factors) or extrinsic (i.e. growth factors and hormones). In some case a complex interplay has been described (He et al. 2004) (Taipale and Beachy 2001). We have recently shown that T<sub>3</sub>-activated TR $\alpha$ 1 receptor controls the proliferation of the intestinal epithelium progenitors (Plateroti et al. 2006). This is achieved by the direct transcriptional regulation of the *ctnnb1* gene, encoding for the  $\beta$ -catenin, the intracellular mediator of the canonical Wnt pathway (Barker and Clevers 2006). This pathway has been described as a key signaling modulator of the physiological and pathological cell proliferation in the intestinal epithelium (Gregorieff and Clevers 2005). Moreover, due to its direct action on the epithelial stem cells, this pathway is considered the main regulator of epithelial homeostasis (Korinek et al. 1998; Pinto et al. 2003).

In order to analyze in a global way the TH responsive genes, we have used here a comparative transcription profile approach on laser microdissected intestinal crypt cells. This approach leaded to define in detail the crosstalk between several genes and signaling pathways in the control of epithelial cell homeostasis. Moreover we describe a new target of the TR $\alpha$ 1, the secreted frizzled related protein sFRP2, which behaves in these cells as a positive regulator of the canonical Wnt pathway. Altogether our previous and current results indicate the key role of the TH signaling pathway through the TR $\alpha$ 1 receptor on intestinal epithelial cells by acting directly and simultaneously on several components of the Wnt/ $\beta$ -catenin to control the cell proliferation.

## Results

### *Isolation of crypt cells by laser microdissection*

In order to characterize in detail the role of the thyroid hormones in the control of the intestinal epithelial cell proliferation in the crypts of Lieberkühn, we have used an approach of laser microdissection as already described (Stappenbeck et al. 2002). This led to isolate a highly pure population of epithelial progenitors. The figure S1 (A-D) summarizes the approach and shows the steps and typical results obtained. Crypt cells were isolated from wild type animals with normal or perturbed TH status, as well as from TR $\alpha$  (Gauthier et al. 2001) and TR $\beta$  knockout mice (Gauthier et al. 1999). Each condition was represented by triplicates, each composed of pools from two animals (see scheme Figure S1 F). For this study we used two-week old mice because: a) the crypts are fully formed (Crosnier et al. 2006); b) Paneth cells -a differentiated epithelial cell type residing in crypts- are not yet present (Bry et al. 1994), c) our previous work showed that crypt cell proliferation at the pre-weaning stage is highly sensitive to TH status (Plateroti et al. 1999; Plateroti et al. 2001; Flamant et al. 2002). Portions of proximal, median and distal small intestine were embedded together for cryosectioning and then microdissection. RNA was isolated from the collected cells and their quality verified before going into the following steps (Figure S1 E). We have also checked by RT-QPCR the purity of the cell population isolated. We only found minor contamination by fibroblasts and myofibroblasts, but not by differentiated epithelial cells (data not shown).

### *Microarray data and statistical analysis*

The hybridization of the 15 pooled cRNA samples was performed on Affymetrix DNA GeneChip “Mouse Expression Array 430A 2.0”. For comparative analysis between the different experimental conditions we used several statistical methods. These are detailed in the Materials and Methods section. One approach consisted in the analysis of variance, or

ANOVA, that permitted the multiple comparisons. The following statistic approaches used the expression values assigned by the Affymetrix software and we performed pair-wised comparisons by using both the Affymetrix Microarray Suite and the two-tailed Student T-test. We have compared WT-TH vs WT-C; WT-PTU vs WT-C; WT-TH vs WT-PTU; TR $\alpha^{0/0}$  vs WT-C; TR $\beta^{-/-}$  vs WT-C. For all the comparisons we filtered for a P-value lower than 0.05 and a fold change of at least 50%. Table 1 illustrates the differentially expressed genes that we have retained, composed of genes whose expression was statistically different in at least two of the tests performed. The pie chart (upper part) represents the repartition of these genes by functions, according to the Netaffix annotations. One can note that a large number of those genes are involved in the cell cycle/proliferation control. This is consistent with the fact that the crypt compartment contains highly proliferative progenitor cells and that this function is regulated by TH (Plateroti et al. 2007).

To confirm the data obtained by microarray and statistics, we performed RT-QPCR analysis on the RNA issued from the laser microdissected cells. This study leaded to validate up to now 75% of the genes tested (116 in total). Figure 1 (A-D) shows some example of genes validated by RT-QPCR in the five experimental conditions studied. All the values are expressed as fold change after normalization with the wild type control condition. Ccnb1 (Figure 1A), Mad2L1 (Figure 1B) and Prkg2 (Figure 1C) genes encode for regulatory proteins involved in the control of cell cycle progression/mitosis (Hardwick 2005; Schlossmann et al. 2005; Lindqvist et al. 2007). It is worth pointing that Prkg2 is regulated in a negative manner by TH, contrariwise to the other illustrated examples. Moreover, one can note that the responsiveness to low or high TH levels or to the lack of TR genes is specific for each gene. This phenomenon has already been described (Yen et al. 2006). Figure 1D illustrates the comparison of gene regulation obtained by the microarray and by RT-QPCR approaches. This comparison focused only on the TH-injected versus the control wild type conditions. It

appears clearly that the overall tendency of gene regulation is similar. It is worth pointing that QPCR gives a higher value of fold change as compared to the values obtained by the microarray. This depends on the higher sensitivity of the QPCR compared to the microarray.

#### *Ingenuity Pathway Analysis of the differentially expressed genes*

For a finer *in silico* study, we used the software Ingenuity Pathway Analysis (IPA) by Ingenuity Systems, which permits the analysis of the input genes by defining group of functions and pathways statistically significant. As concerning the grouping by functions, the highest scores were obtained by the “cell growth and proliferation; cancer; cell cycle” (Figure 2A). This, again, was in agreement with the isolation of a highly proliferating cell population and with the positive control of cell proliferation by TH previously described (Plateroti et al. 2001). Next, we analyzed the canonical pathways associated with our differentially regulated genes (Figure 2B). We found that the signalling pathways playing key roles in the crypt cell homeostasis, such as Wnt and BMP/TGF $\beta$  were statistically represented. We have performed this same analysis by using the list of the genes validated by RT-QPCR. The results illustrated in Figure S2, show similar functional grouping and canonical pathways as before validation. Finally, we used the gene network tool, which provides functional relations between the input genes, based on the large body of literature. The highest score concerned the “cell cycle/cell proliferation” network, entirely composed by 35 of the input genes (Figure 2C).

#### *Focus on the cell cycle/proliferation network*

We decided to focus on this network since it gives a good evidence of the global response to the TH-mediated proliferative stimulus in crypt cells. This network is composed by two major nodes. One is Fos, which resulted up-regulated by TH treatment. The up-regulation of Fos is then responsible for the increased expression of Cyclins A2 and B1 as well as the Cdc2. This

is coherent with the reported positive function of Fos in normal and pathological cell proliferation (Hess et al. 2004). Interestingly, we found a functional link between Cdc2, Mad2L1 and Bub1b, all positively regulated by TH. The last two proteins control the correct mitotic spindle formation (Hempen et al. 2003; Hardwick 2005), and a recent report describes their up-regulation as well as their involvement in the chromosomal instability in colorectal cancers, induced by the Adenomatous Polyposis Coli (Apc) loss of function (Abal et al. 2007). The second major node is Ctnnb1 gene, encoding for  $\beta$ -catenin the intracellular mediator of the canonical Wnt, already described as a TH-TR $\alpha$ 1 target (Plateroti et al. 2006). Interestingly  $\beta$ -catenin up-regulation leads to down-regulation of the cell cycle inhibitor Cdkn1c, according to its role as positive regulator of crypt cell proliferation. This is also in agreement with other study (Castelo-Branco et al. 2004). On the other hands, the positive regulation of the  $\beta$ -catenin is also linked to the stimulation of two genes involved in the cell fate, such as Notch1 (stem cell maintenance) and NeuroD1 (progenitor cell commitment). A surprising as well interesting result was the positive relation between the frizzled-related protein sFRP2 and the  $\beta$ -catenin. This was in agreement with the work described in (Lee et al. 2004). It is worth pointing that sFRP proteins have been proposed as negative regulators of the canonical Wnt, because of their sequence homology with the membrane receptors frizzled. In fact, it has been suggested that they compete with the frizzled receptors by sequestering Wnt (rev. in (Jones and Jomary 2002; Kawano and Kypta 2003)). However, several papers also suggested a potential role for sFRP2 in stabilizing  $\beta$ -catenin and subsequently in activating its target genes (Lee et al. 2003; Mirotso et al. 2007).

#### *Sfrp2 is a target gene of TH in vivo and in vitro*

We focused on the *sFRP2* gene for two main reasons: a) it is the gene displaying the highest differential expression upon treatment with TH, and b) it participates to the Wnt/ $\beta$ -catenin



pathway. Moreover, as said before, the sFRP2 action on canonical Wnt was described in contradictory terms: either on repression or activation. We had the opportunity to study its function and to clarify its role in the intestinal epithelial progenitors.

First of all we have validated its differential expression depending on the TH status or on the TR genotype *in vivo*. We performed QPCR analysis on cDNA from microdissected mouse intestinal crypt cells. Figure 3A shows that sFRP2 mRNA expression levels in WT crypts are lower in hypothyroid and are stimulated in hyperthyroid compared to the control condition. As the level of this mRNA is also decreased in TR $\alpha^{0/0}$  compared to the wild type control crypts, we conclude that its regulation by TH depends on the TR $\alpha$ 1 receptor. On the other hand, TR $\beta^{-/-}$  mice show an increased level of sFRP2 mRNA expression, as compared to the WT mice in control condition. This is in agreement with the fact that these mice are congenitally hyperthyroid (Gauthier et al. 1999). We have also quantified the sFRP2 protein levels in the intestinal epithelial cells by western blot (Figure 3B). We have fractionated these cells from the villus-crypt axis as previously described (Weiser 1973b; Weiser 1973a), and verified that the first two fractions were enriched of villus-differentiated cells and the last fractions of proliferating progenitors (Figure S4). We analysed the expression of the sFRP2 protein in the four fractions recovered from wild type animals injected or not with TH for 24h (figure 3B). This study clearly revealed that the sFRP2 protein is present at almost comparable levels along the villus-crypt axis in control animals (compare lanes 1-4). However, the injection of TH in animals increased the protein level specifically in the two last fractions corresponding to crypt-associated progenitors (compare lanes 3',4' vs 3,4).

To analyze whether the regulation of sFRP2 by TH is epithelial cell-autonomous, we used intestinal epithelium primary cultures maintained in the absence or in presence of T<sub>3</sub> for 24 hours (Figure 3C). The mRNA levels of sFRP2 were clearly increased by T<sub>3</sub> treatment *in vitro*. We then wanted to test whether this regulation was independent from protein neo-

synthesis. Unfortunately, the simultaneous treatment with T<sub>3</sub> and cycloheximide led to an overall decrease of gene expression, as we have already reported (Plateroti et al. 2006). In this condition we were unable to detect sFRP2 transcripts. Instead we performed a short-term T<sub>3</sub> treatment (Figure 3D), and the result clearly showed a positive regulation of sFRP2 mRNA expression after 6 hours of T<sub>3</sub> treatment, strongly suggesting that this gene might be a direct target of the T<sub>3</sub>-TR $\alpha$ 1.

By *in silico* approach we found a putative TRE located at -924 bp from the transcription start site (Figure S3). To check whether this TRE is a binding site for TR $\alpha$ 1 *in vivo*, we carried out *in vivo* ChIP assay. We performed these experiments on collagenase-dispase isolated intestinal epithelium, freshly prepared from newborn animals. The sonicated chromatin has been incubated with anti-TR $\alpha$ 1, anti-TR $\beta$ 1, or preimmune sera. The precipitated DNA from these different experimental conditions and in the starting inputs was then analyzed by conventional PCR to reveal the presence of specific DNA templates. Interestingly, using specific primers which amplify a fragment of DNA comprising the TRE, we showed a band only in the samples incubated with the anti-TR $\alpha$ 1 antibody (Figure 3E). When we used primers that amplify regions located 1 kb or 3 kb from the TRE, DNA fragments were amplified only in the starting inputs, indicating the anti-TR $\alpha$ 1 antibody does not bind to chromatin aspecifically. This has also been confirmed by using primers specific to the promoter of the phosphoriboprotein gene 36B4, for which no regulation by TH has been described. These data clearly demonstrated that, in intestinal epithelial cells *in vivo*, TR $\alpha$ 1 binds to the sFRP2 promoter on the region comprising the TRE sequence.

#### *sFRP2 stabilizes $\beta$ -catenin*

sFRP2 action on Wnt/ $\beta$ -catenin appears different depending on the cellular/tissue system (Jones and Jomary 2002; Kawano and Kypta 2003; Lee et al. 2003; Mirotso et al. 2007)).

Our result on its strong positive regulation by TH-TR $\alpha$ 1 *in vivo* and *in vitro* was intriguing. We took the advantage of the intestinal epithelium primary culture model to study in detail its action on the  $\beta$ -catenin as well as its function on epithelial progenitor cell proliferation.

To check whether sFRP2 acts on the  $\beta$ -catenin, we treated the intestinal epithelium primary cultures with increasing amount of recombinant sFRP2 protein and monitored the mRNA levels of c-Myc (Figure 4A) and Cyclin D1 (not shown), established target genes of  $\beta$ -catenin (He et al. 1998; Shtutman et al. 1999). From this experiment it was clear that an optimal concentration of sFRP2 (50 ng/ml) stimulated Wnt/ $\beta$ -catenin targets. This resulted from the stabilization of the  $\beta$ -catenin. In fact, we have analyzed the levels of non-phosphorylated  $\beta$ -catenin by WB on primary cultures treated with T<sub>3</sub> or with sFRP2 (Figure 4B). In both conditions, compared to the control, the levels of the activated non-phosphorylated  $\beta$ -catenin were greatly increased. Next we checked the levels of secreted sFRP2 in the culture medium of the cells treated or not with T<sub>3</sub>. As reported in Figure 4C, T<sub>3</sub> greatly stimulated the levels of sFRP2 in the culture medium. To definitively link the T<sub>3</sub> treatment *in vitro* and the action of sFRP2 on  $\beta$ -catenin stabilization, we co-treated the cells with T<sub>3</sub> and with an anti-sFRP2 antibody. c-Myc (Figure 4D) and Cyclin D1 (not shown) mRNAs were analyzed by RT-QPCR. From this experiment it resulted that by blocking sFRP2 with the antibody, the stimulation of c-Myc mRNA expression by T<sub>3</sub> was blunted. This was specifically due to the anti-sFRP2 antibody, as the addition of an anti-GFP antibody was unable to block the positive action of T<sub>3</sub> on  $\beta$ -catenin gene targets (not shown).

The consequence of  $\beta$ -catenin stabilization in the intestinal epithelial progenitors is its nuclear translocation and the activation of cell proliferation (Clevers 2006). We analyzed the effects of sFRP2 on the accumulation of nuclear  $\beta$ -catenin and on cell proliferation. This was realized by treating the primary cultures with T<sub>3</sub> or by the exogenous addition of sFRP2 in the culture medium. The proportion of  $\beta$ -catenin and BrdU positive nuclei has been analyzed by

immunofluorescence followed by cell counting under the microscope (Figure 5 A-R). As summarised in Figure 5Q and 5R, in the absence of treatment nearly 5% of cells showed nuclear  $\beta$ -catenin, 15% were proliferating BrdU positive cells and a small fraction were double-stained (Figure 5D). By contrast, upon increasing the levels of sFRP2 either in T3- or sFRP2-treated cultures the frequency of cells displaying nuclear  $\beta$ -catenin and incorporating BrdU greatly and significantly increased. Finally, most of the cells displayed nuclear co-staining for BrdU and  $\beta$ -catenin (Figure 5 H,L vs D). When an antibody against sFRP2 was added to T3 treated cells, both the number of cells displaying nuclear  $\beta$ -catenin and BrdU were significantly reduced to the control levels (figure 5 Q,R). These data clearly show that the sFRP2 gene, transcriptionally induced by T3-TR $\alpha$ 1, acts as positive activator of the canonical Wnt, by stabilizing  $\beta$ -catenin and by increasing the cell proliferation of the intestinal epithelial progenitors *in vitro*.

To analyze whether TH treatment is able to induce  $\beta$ -catenin nuclear translocation *in vivo* as *in vitro*, we have used WT animals with normal or altered TH status (Figure 6). Immunohistochemical analysis on intestinal sections, revealed a crypt-specific induction of  $\beta$ -catenin expression upon TH treatment (Figure 6 G-I vs A-C). This was accompanied by a clear expression of  $\beta$ -catenin in some nuclei of crypt cells. These data were further confirmed by western blot performed on protein extracts from the villus-crypt fractions. As reported in Figure 6H and in agreement with other publications (Pinto and Clevers 2005), the activated non-phosphorylated  $\beta$ -catenin is mainly expressed by the crypt fraction. When the animals were injected with the TH before epithelial cell fractionation, the levels of the activated  $\beta$ -catenin was greatly increased in the crypt fraction Figure 6H, compare lane 4 vs 4'). It is worth underline that sFRP2 was also upregulated in this same cellular fraction (Figure 3B). These data strongly suggest that by increasing the expression of sFRP2, TH leads to the activation of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway *in vivo* as well as *in vitro*.



## Discussion

The comparative transcription profile of crypt cells, microdissected from the small intestine of mice with normal and altered TH status as well as from TR $\alpha$  or TR $\beta$  knockouts, led to compile a comprehensive list of differentially regulated genes. Some of these genes have been already reported as TH-targets in other organs (i.e. Cdkn1a and Apobec1 in liver. (Yen et al. 2003)) or in the intestine during the TH-induced metamorphosis (i.e. Bub1b, ccna1 (Buchholz et al. 2007)). The gene Ontology Annotations by Netaffyx as well as the Ingenuity Pathway Analysis helped describe and group genes with similar functions, belonging to the same canonical pathway or functionally linked. This represented a good starting point for a more detailed analysis aimed at defining how the TH and TR $\alpha$ 1 control the proliferation of the crypt progenitor cells. The laser microdissection approach to analyze transcription profile has been extensively used in medical research for tumor-signature studies (Esposito 2007). In fact, several reports describe results in intestinal cancers in both human or mouse (Fevr et al. 2007). In fundamental research this approach seems to be less used. This can be due to the fact that it is time-consuming and the recovery of good quality RNA after the microdissection difficult. Despite these side-points our study has been successful and the results obtained by comparing the five experimental conditions linked to the TH-signalling are both original and promising. It is worth pointing that other methods to isolate crypt cells, such as that described by Weiser (Weiser 1973b), are more prone to the contamination by the differentiated cells or other cell types and don't apply very well to the neonatal mouse intestine.

Our study provided evidence for different modalities of gene activation in the presence or absence of T<sub>3</sub> and/or in the absence of TRs. This had already been observed in other analyses (Yen et al. 2003). Moreover, we have described an almost similar number of genes up- or down-regulated by TH in our system, in agreement with others (Flores-Morales et al. 2002;

Yen et al. 2003). One new and surprising result from our study derives from the analysis of the TRE characterized on the sFRP2 gene promoter. In fact it is composed of two direct repeats separated by 8 nucleotides (DR8), which is quite uncommon. However, it is constituted by two perfect canonical half-sites (TGGTCA-5'). Whether TRs can bind to half-sites is still debated (Glass 1994). However, looking carefully to the described TRE in the literature all possible combination of DRs, IRs (Inverted Repeats) and ERs (Everted Repeats) can be found (Glass 1994). In this respect, more studies are necessary to clearly understand the kinetics and the chemistry of TR binding on target sequences *in vivo*.

The functional link between the TH-TRs and the canonical Wnt has been the focus of some studies (Miller et al. 2001; Natsume et al. 2003; Plateroti et al. 2006). Puzzlingly, it depends on the organ/cell type whether TH activates or represses actors of the Wnt pathway. This is probably due to the fact that in some organ TH induces cell differentiation (Pasquini and Adamo 1994) and in others cell proliferation (Columbano et al. 2006). We have shown that in highly proliferating progenitors of crypts TH via the TR $\alpha$ 1 receptor induces the expression of the  $\beta$ -catenin gene expression. This in turn activates its targets Cyclins D1 and D2 as well as c-Myc (Plateroti et al. 2006), all positive regulators of cell proliferation (Chandrasekaran et al. 1996; van de Wetering et al. 2002; Lynch et al. 2003). The nuclear action of  $\beta$ -catenin depends on its previous stabilization (Clevers 2006). Despite our data showing the up-regulation of  $\beta$ -catenin and its molecular targets, we weren't able to define how  $\beta$ -catenin gets stabilized. We described here another actor of the Wnt pathway as a direct target of the TH-TR $\alpha$ 1. It is the frizzled-related sFRP2 gene that, in the crypt cells, behaves as an activator of the  $\beta$ -catenin. Altogether, in the intestinal epithelial progenitors, TH act simultaneously on *ctnnb1* and sFRP2 genes to increase and stabilize the levels of the  $\beta$ -catenin and finally stimulating the cell proliferation.

Since their discovery, sFRP proteins have been proposed as negative regulators of the canonical Wnt, because of their sequence homology with the membrane receptors frizzled (rev. in (Jones and Jomary 2002; Kawano and Kypta 2003)). In fact, it has been suggested that they compete with the frizzled receptors by sequestering Wnt (rev. in (Jones and Jomary 2002; Kawano and Kypta 2003)). However, several papers also suggested a potential role for sFRP2 in stabilizing  $\beta$ -catenin and subsequently in activating its target genes (Lee et al. 2003; Lee et al. 2004; Mirotsoy et al. 2007). The potential competitive interaction by direct binding of SFRPs to Wnts may be biphasic (Uren et al. 2000), leading to augmentation of signaling at lower SFRP levels; and *in vitro* evidence points to opposing effects of sFRP1 and sFRP2 on intracellular  $\beta$ -catenin levels. sFRPs may then sequester Wnts or facilitate their transport to alternative cellular sites, and it seems plausible that additional molecules regulating SFRP–Wnt interactions may exist. As is increasingly recognized in signaling systems, the molecular and cellular contexts for signal transmission may be crucial in determining the final outcome of initial ligand–receptor bindings. Different Wnts acting on the same cells may exert opposing effects (Logan and Nusse 2004). In this regard, noncanonical Wnts can antagonize the effects of canonical Wnts within the same cell (Logan and Nusse 2004; Wang 2004). It thus is possible that Sfrp2 binds locally present Wnts and alters the balance of intracellular Wnt signaling within the crypt cells to favour the activation of the canonical pathway. In order to verify whether sFRP2 and T<sub>3</sub> were acting by parallel mechanisms we co-treated primary cultures with T<sub>3</sub> and sFRP2. However, cell proliferation was not increased by the simultaneous treatment (not shown). Moreover stimulation by either Wnt3a or sFRP2, induces a similar increase of the Cyclin D1 mRNA expression (not shown). This clearly indicates that sFRP2 might induce the stabilization of  $\beta$ -catenin through frizzled receptors as does Wnt.



It has been shown that in colon cancers sFRP2 gene is methylated, leading to a decrease of the sFRP2 expression (Cheng et al. 2007). This has been considered a mechanism underlying the activation of the canonical Wnt in the absence of a negative regulator. There is then a contradiction with our data showing that sFRP2 is an activator of Wnt/ $\beta$ -catenin in intestinal progenitors. However, discrepancies are only apparent as in colon cancers the studies showed the coincidence of the two phenomena which can each result from independent events. On the other hands, it is possible that sFRP2 can behave in a dual fashion, as it has also been suggested by some reports: at low local concentration can be an activator and higher concentration blocks the Wnt (Jones and Jomary 2002). When we analyzed this possibility in primary cultures we couldn't observe this duality. It is possible that our *in vitro* model doesn't recapitulate the *in vivo* complexity. However, our data on animals stimulated by TH injection also correlated the increased expression of sFRP2 to the increased stabilization of  $\beta$ -catenin. This result is clearly in agreement with its positive action on canonical Wnt *in vivo*.

In conclusion, we described here the complex interplay between the TH-TR $\alpha$ 1 and other signalling pathways, key regulators of intestinal epithelial progenitor homeostasis. By focusing in particular on the canonical Wnt, we describe a new modality of  $\beta$ -catenin stabilization by sFRP2. In view of the key function of the canonical Wnt in intestinal homeostasis, our work opens new perspective in the study of TR $\alpha$ 1 as potential inducer of cell transformation and eventually tumorigenesis.

## **Materials and Methods**

### **Animal treatment and tissue preparation for Laser Capture Microdissection**

TR $\alpha^{0/0}$  and TR $\beta^{-/-}$  and the respective wild-type animals have been used in this study. Mice were housed and maintained with approval from the animal experimental committee of the Ecole Normale Supérieure de Lyon (Lyon, France), and in accordance with European legislation on animal care and experimentation. TH deficiency in pups was induced by feeding the mothers a low-iodine diet supplemented with 0,15% propylthiouracil (PTU; Harland/Teklab) for two weeks. Hyperthyroidism was induced by IP injection of a mixture of T4 and T3 (2.5 mg/kg T4 and 0.25 mg/kg T3 in 100  $\mu$ L of phosphate-buffer saline) for 24 hours. Control animals were fed with standard mouse chow. Animals were euthanatized at 14 days and segments (1-centimetre) of proximal, median and distal small intestine were quickly removed, embedded together in Tissu-Teck mounting medium and frozen at -80°C until cryosectioning. TH status of the animals was controlled by recovering the blood and measuring the levels of free T3 and T4 (Biomerieux).

### **Laser Capture Microdissection and GeneChip analysis**

Tissue-Tek embedded intestine fragments were prepared for LCM by using the protocol described in (Stappenbeck et al. 2002). 10  $\mu$ m cryosections were subjected to microdissection. The crypt cells were harvested using a PixCell II LCM system (Arcturus, Mountain View) on CapSure HS LCM caps (Arcturus). The parameters used were: laser spot diameter 7.5  $\mu$ m, pulse power 43 mW, power width 0.9 ms. Around one thousand crypt-cells per animal were recovered. Total cellular RNA was extracted with the RNeasy micro kit (Qiagen). To avoid the presence of contaminating DNA in RNA samples, DNase digestion (Qiagen) has been performed in all preparations. All the protocols used the manufacturer's instructions. RNA quality from all the samples has been tested by capillary electrophoresis (Agilent apparatus).

For each condition 20 ng of RNA (pool from two mice) were amplified and labelled by using the two-Cycle Target Labelling Assay and following the manufacturer's instructions (Affymetrix GeneChip® Expression Analysis Technical Manual). Each experimental condition was represented by triplicates. The labelled cRNAs were hybridized on Affymetrix DNA GeneChip "Mouse Expression Array 430A 2.0". To verify the quality of hybridization, bacterial cRNA (BioB, BioC, BioDn and CreX, respectively 0.75, 2.5, 12.5 et 50 pM) were added to the cRNAs before the hybridization step. Each microarray was scanned using Affymetrix GeneChip Scanner 3000. Image processing and analysis were performed using Affymetrix MAS 5.0 software. The resulting intensities and coordinate information were saved in a CEL file format and then subjected to global scaling to allow for direct comparison of hybridization values from different targets. Scaled results for each sample were saved as CHP files, and these data were used to evaluate overall chip performance. The analysis indicated that the parameters describing the quality of RNA, hybridization, and detection were all within acceptable range. The data have been normalized and then used to identify changed genes and determine the statistical significance and magnitude of changes (fold change). The data were annotated with NCBI Unigene IDs and with related Gene Ontology terms by using the Affymetrix NetAffx tool.

*Statistics.* Pair-wise comparisons (WT-PTU vs WT-C; WT-TH vs WT-C; WT-TH vs WT-PTU; TR $\alpha^{0/0}$  vs WT-C; TR $\beta^{-/-}$  vs WT-C) were performed with Affymetrix Microarray Suite software 5.0 and two-tailed Student's T-Test (Zoe software). With Affymetrix tool, the genes were selected based on the following criteria: (i) Increased or Decrease in at least 5 comparisons out of 9, (ii) Signal Log Ratio >0.8 (for the Increased) and <-0.8 (for the Decreased) in at least 5 comparisons out of 9. With the Student's T-Test we imposed the following criteria: (i) pValue<0.05, (ii) Fold Change (mean group X/ mean group control) at least 50%. Finally by applying the ANOVA test for multiple comparisons, we fixed the

pValue<0.01. Each analysis led to compile a sub-list of genes differentially regulated. For the final list we retained only the genes present at least in two of the three sub-lists.

*Ingenuity Pathway Analysis.* The associations between the genes were further evaluated using the Ingenuity Pathways Analysis software (Ingenuity Systems). Affymetrix identifiers of the differentially expressed genes and their corresponding expression values (represented as fold change) were loaded into the software and mapped to its corresponding gene object (so-called focus genes) in the Ingenuity Pathways Knowledge Base. The significance of the associations in functional groups, networks or canonical pathways used the Fisher's exact test to calculate a P-Value. This estimated the probability that a particular functional classification or category of genes is associated with a particular pattern or cluster of gene expression more than would be expected by chance. Networks of these focus genes were algorithmically generated based on the relationships of individual genes as derived from literature review and used to identify the biological functions and/or associated pathological processes. Genes or gene products are represented as nodes, and biological relationships between nodes are represented as edges (lines). All edges are supported by at least one literature reference from a manuscript, or from canonical information stored in the Ingenuity Pathways Knowledge Base.

### **Primary culture of intestine epithelial cells and isolation of villus-crypt epithelial fractions**

Primary intestinal epithelial cell cultures were derived from 4-6 day neonatal mice. After euthanasia, the small intestine was removed. The epithelium was isolated as intact organoids using a protocol described in (Plateroti et al. 2006). Organoids were plated in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Invitrogen) supplemented with 2.5% heat inactivated foetal calf serum (Gibco) depleted in T3 and T4 (Samuels 1979), 20 ng/ml EGF (Sigma) and insulin-transferrin-selenium diluted 1/100 (ITS, Sigma). For immunolabelling experiments

coverslips were inserted in the wells. Culture surfaces were coated with type 1 collagen. Cells have been analysed after four days of culture. For the analysis of  $T_3$  action *in vitro*,  $2 \times 10^{-7} M$   $T_3$  or the vehicle alone has been added to the culture medium for the indicated length of time. For proliferation studies,  $10 \mu M$  BrdU has been added to the culture medium during an overnight incubation. To study the action of sFRP2 *in vitro* we added the recombinant sFRP2 (R&D Systems) to the culture medium for 24h, at the indicated concentrations. sFRP2-blocking experiments have been performed by addition of  $1 \mu g/ml$  anti-sFRP2 antibody (Santa Cruz) for 24h. At the end of culture, the cells have been washed twice with PBS and frozen at  $-80^\circ C$  until use for RNA or protein extraction or fixed in paraformaldehyde for immunofluorescence.

The sequential isolation of mouse small intestinal epithelial cells along the villus-crypt axis from 1-month old mice has been previously described and validated (Weiser 1973b; Weiser 1973a). Briefly, the small intestine was removed and opened lengthwise and washed several time with PBS. It was then incubated with shaking at  $37^\circ C$  for 10 minutes in PBS containing  $1.5 mM$  EDTA and  $0.5 mM$  DTT buffer. Epithelial cells were collected after 4 consecutive incubation steps lasting 10 minutes (fraction 1), 10 minutes (fraction 2), 30 minutes (fraction 3), and 20 minutes (fraction 4) respectively. With this method fractions 1 and 2 are mainly enriched by differentiated cells of villi, and fractions 3 and 4 mainly by crypt cells. The recovered fractions have been collected as pellets and stored at  $-80^\circ C$  until use for RNA or protein extraction.

### **RNA preparation and analysis**

RNA from primary cultures was extracted using the Stratagene Absolutely RNA nanoprep kit (Stratagene). RNA from epithelial fractions was extracted from tissues using the QIAGEN RNeasy kit (Qiagen). To avoid contamination with DNA, DNase (Qiagen) digestion was

performed according to the manufacturer's instructions. Reverse Transcription was performed on 1 µg of RNA extracted using the Sprint PowerScript PrePrimed SingleShots with Random Hexamer Primers (Clontech). For the RNA issued by laser microdissection, 1 ng of RNA was retro-transcribed.

### **Quantitative PCR**

Simplex. QPCR analyses were performed with SYBR green PCR master mix (Qiagen) in a MXP3000 apparatus (Stratagene). The data from the PCR were normalized to that of 36B4 levels in each sample. The primers used are listed in Figure S4.

Multiplex. We used dual labelled probes and multiplex amplification in a Stratagene MX3000 apparatus, using the Comparative Quantitation program. The TaqMan sets were designed by using the Beacon Designer software (Premier Biosoft) and the oligonucleotide synthesized by MWG (sequences available upon request). Dual labelled probes were coupled with BlackHoleQuencher 1 in 3' and FAM in 5', except the normalizing gene 36B4 that was labelled in 5' with HEX, to perform multiplexing of the amplification. We used the Brilliant Multiplex QPCR Master Mix from Stratagene according to the manufacturer's instruction. The final concentrations of oligonucleotides were 300 mM for the primers and 200 mM for the probe.

### **Immunostaining and western blot**

Immunolabelling for  $\beta$ -catenin (Santa Cruz) and BrdU (Roche) has been done on 2% paraformaldehyde fixed cell cultures. Secondary fluorescent antibodies were from Jackson Laboratories. Nuclei were stained by Hoechst. Fluorescence microscopy was performed on a Zeiss Axioplan microscope.

Whole proteins from fractionated epithelial cells were extracted by using the total RNA and protein isolation kit (Macherey-Nagel). Protein lysate from cell cultures were obtained by adding the SDS-loading buffer directly to the culture dish. Analysis of proteins in the culture medium was conducted on media concentrated with the centrifugal filter devices (Centricon, Millipore). Proteins were separated on 8-10% Acrylamide–Bis Acrylamide (29:1) gel and transferred to nitrocellulose membrane (Hybond ECL) before incubation with the first antibody. This was followed by incubation with secondary anti-rabbit or anti-mouse IgG HRP conjugated (Promega). The signal was analysed using enzymatic chemiluminescence detection kit (Amersham). We used the following primary antibodies: anti-sFRP2 (Santa Cruz), anti- $\beta$ -catenin (Santa Cruz), anti-activated  $\beta$ -catenin (Upstate), anti-actin (Sigma).

### **Chromatin IP and DNA analysis**

The Chromatin immunoprecipitation study was performed on collagenase-dispase separated epithelial fragments from 3-to-5-day-old mouse intestines as previously described (Plateroti et al. 2006). The ChIP was performed using the protocol described in (Plateroti et al. 2006). For the conventional PCR, we used the Euroblue Taq (Eurobio). All the amplicons have been controlled by sequencing. Oligonucleotides are listed in Figure S3 B.

### **Acknowledgments**

We gratefully acknowledge Nadine Aguilera for animal handling. We thank Drs C. Thibault and P. Kastner of the Affymetrix platform Illkirch, France. A special thank to Catherine Rey and Gaëlle Cavillon of the laser microdissection platform Neurobiotech Lyon, France, and to Cédric Savouret, of the Stratagene technical services. Thanks to Timothy Osborne (University of California Irvine, CA, USA) for helpful discussion and the critical reading of the manuscript. This work was supported by the Réseau National des Genopoles, Agence

Nationale pour la Recherche (grant ANR-06-BLAN-0232-01), the program Equipe Labellisée of the Ligue Nationale contre le Cancer and the European Network of excellence CRESCENDO. EK and AR studentships are supported by the Ligue Nationale contre le Cancer. MP is supported by INSERM.



## References

- Abal, M., Obrador-Hevia, A., Janssen, K.P., Casadome, L., Menendez, M., Carpentier, S., Barillot, E., Wagner, M., Ansorge, W., Moeslein, G., Fsihi, H., Bezrookove, V., Reventos, J., Louvard, D., Capella, G., and Robine, S. 2007. APC inactivation associates with abnormal mitosis completion and concomitant BUB1B/MAD2L1 up-regulation. *Gastroenterology* 132(7): 2448-2458.
- Alisi, A., Demori, I., Spagnuolo, S., Pierantozzi, E., Fugassa, E., and Leoni, S. 2005. Thyroid status affects rat liver regeneration after partial hepatectomy by regulating cell cycle and apoptosis. *Cell Physiol Biochem* 15(1-4): 69-76.
- Barker, N. and Clevers, H. 2006. Mining the Wnt pathway for cancer therapeutics. *Nature reviews* 5(12): 997-1014.
- Bockhorn, M., Frilling, A., Benko, T., Best, J., Sheu, S.Y., Trippler, M., Schlaak, J.F., and Broelsch, C.E. 2007. Tri-iodothyronine as a stimulator of liver regeneration after partial and subtotal hepatectomy. *European surgical research Europäische chirurgische Forschung* 39(1): 58-63.
- Bry, L., Falk, P., Huttner, K., Ouellette, A., Midtvedt, T., and Gordon, J.I. 1994. Paneth cell differentiation in the developing intestine of normal and transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91(22): 10335-10339.
- Buchholz, D.R., Heimeier, R.A., Das, B., Washington, T., and Shi, Y.B. 2007. Pairing morphology with gene expression in thyroid hormone-induced intestinal remodeling and identification of a core set of TH-induced genes across tadpole tissues. *Developmental biology* 303(2): 576-590.

- Castelo-Branco, G., Rawal, N., and Arenas, E. 2004. GSK-3 $\beta$  inhibition/ $\beta$ -catenin stabilization in ventral midbrain precursors increases differentiation into dopamine neurons. *Journal of cell science* 117(Pt 24): 5731-5737.
- Chandrasekaran, C., Coopersmith, C.M., and Gordon, J.I. 1996. Use of normal and transgenic mice to examine the relationship between terminal differentiation of intestinal epithelial cells and accumulation of their cell cycle regulators. *The Journal of biological chemistry* 271(45): 28414-28421.
- Cheng, S.Y. 2003. Thyroid hormone receptor mutations in cancer. *Molecular and cellular endocrinology* 213(1): 23-30.
- Cheng, Y.Y., Yu, J., Wong, Y.P., Man, E.P., To, K.F., Jin, V.X., Li, J., Tao, Q., Sung, J.J., Chan, F.K., and Leung, W.K. 2007. Frequent epigenetic inactivation of secreted frizzled-related protein 2 (SFRP2) by promoter methylation in human gastric cancer. *Br J Cancer* 97(7): 895-901.
- Clatworthy, J.P. and Subramanian, V. 2001. Stem cells and the regulation of proliferation, differentiation and patterning in the intestinal epithelium: emerging insights from gene expression patterns, transgenic and gene ablation studies. *Mech Dev* 101(1-2): 3-9.
- Clevers, H. 2006. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in development and disease. *Cell* 127(3): 469-480.
- Columbano, A., Pibiri, M., Deidda, M., Cossu, C., Scanlan, T.S., Chiellini, G., Muntoni, S., and Ledda-Columbano, G.M. 2006. The thyroid hormone receptor-beta agonist GC-1 induces cell proliferation in rat liver and pancreas. *Endocrinology* 147(7): 3211-3218.
- Crosnier, C., Stamataki, D., and Lewis, J. 2006. Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control. *Nat Rev Genet* 7(5): 349-359.

- Esposito, G. 2007. Complementary techniques: laser capture microdissection--increasing specificity of gene expression profiling of cancer specimens. *Advances in experimental medicine and biology* 593: 54-65.
- Fevr, T., Robine, S., Louvard, D., and Huelsken, J. 2007. Wnt/ $\beta$ -Catenin Is Essential for Intestinal Homeostasis and Maintenance of Intestinal Stem Cells. *Mol Cell Biol* 27(21): 7551-7559.
- Flamant, F., Poguet, A.L., Plateroti, M., Chassande, O., Gauthier, K., Streichenberger, N., Mansouri, A., and Samarut, J. 2002. Congenital hypothyroid Pax8(-/-) mutant mice can be rescued by inactivating the TRalpha gene. *Mol Endocrinol* 16(1): 24-32.
- Flores-Morales, A., Gullberg, H., Fernandez, L., Stahlberg, N., Lee, N.H., Vennstrom, B., and Norstedt, G. 2002. Patterns of liver gene expression governed by TRbeta. *Mol Endocrinol* 16(6): 1257-1268.
- Gauthier, K., Chassande, O., Plateroti, M., Roux, J.P., Legrand, C., Pain, B., Rousset, B., Weiss, R., Trouillas, J., and Samarut, J. 1999. Different functions for the thyroid hormone receptors TRalpha and TRbeta in the control of thyroid hormone production and post-natal development. *Embo J* 18(3): 623-631.
- Gauthier, K., Plateroti, M., Harvey, C.B., Williams, G.R., Weiss, R.E., Refetoff, S., Willott, J.F., Sundin, V., Roux, J.P., Malaval, L., Hara, M., Samarut, J., and Chassande, O. 2001. Genetic analysis reveals different functions for the products of the thyroid hormone receptor alpha locus. *Mol Cell Biol* 21(14): 4748-4760.
- Glass, C.K. 1994. Differential recognition of target genes by nuclear receptor monomers, dimers, and heterodimers. *Endocrine reviews* 15(3): 391-407.
- Gonzalez-Sancho, J.M., Garcia, V., Bonilla, F., and Munoz, A. 2003. Thyroid hormone receptors/THR genes in human cancer. *Cancer Lett* 192(2): 121-132.

- Gregorieff, A. and Clevers, H. 2005. Wnt signaling in the intestinal epithelium: from endoderm to cancer. *Genes & development* 19(8): 877-890.
- Hardwick, K.G. 2005. Checkpoint signalling: Mad2 conformers and signal propagation. *Curr Biol* 15(4): R122-124.
- He, T.C., Sparks, A.B., Rago, C., Hermeking, H., Zawel, L., da Costa, L.T., Morin, P.J., Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. 1998. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science (New York, NY)* 281(5382): 1509-1512.
- He, X.C., Zhang, J., Tong, W.G., Tawfik, O., Ross, J., Scoville, D.H., Tian, Q., Zeng, X., He, X., Wiedemann, L.M., Mishina, Y., and Li, L. 2004. BMP signaling inhibits intestinal stem cell self-renewal through suppression of Wnt-beta-catenin signaling. *Nat Genet* 36(10): 1117-1121.
- Hempen, P.M., Kurpad, H., Calhoun, E.S., Abraham, S., and Kern, S.E. 2003. A double missense variation of the BUB1 gene and a defective mitotic spindle checkpoint in the pancreatic cancer cell line Hs766T. *Human mutation* 21(4): 445.
- Hess, J., Angel, P., and Schorpp-Kistner, M. 2004. AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings. *Journal of cell science* 117(Pt 25): 5965-5973.
- Horkko, T.T., Tuppurainen, K., George, S.M., Jernvall, P., Karttunen, T.J., and Makinen, M.J. 2006. Thyroid hormone receptor beta1 in normal colon and colorectal cancer-association with differentiation, polypoid growth type and K-ras mutations. *International journal of cancer* 118(7): 1653-1659.
- Iishi, H., Tatsuta, M., Baba, M., Okuda, S., and Taniguchi, H. 1992. Enhancement by thyroxine of experimental carcinogenesis induced in rat colon by azoxymethane. *International journal of cancer* 50(6): 974-976.
- Jones, S.E. and Jomary, C. 2002. Secreted Frizzled-related proteins: searching for relationships and patterns. *Bioessays* 24(9): 811-820.

- Karam, S.M. 1999. Lineage commitment and maturation of epithelial cells in the gut. *Front Biosci* 4: D286-298.
- Kawano, Y. and Kypta, R. 2003. Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. *Journal of cell science* 116(Pt 13): 2627-2634.
- Korinek, V., Barker, N., Moerer, P., van Donselaar, E., Huls, G., Peters, P.J., and Clevers, H. 1998. Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4. *Nat Genet* 19(4): 379-383.
- Kress, E., Rezza, A., Nadjar, J., Samarut, J., and Plateroti, M. 2007. The TR{alpha} gene encoding the thyroid hormone receptor TR{alpha}1 controls DNA-damage induced tissue repair. *Mol Endocrinol*.
- Laudet, V., Hanni, C., Coll, J., Catzeflis, F., and Stehelin, D. 1992. Evolution of the nuclear receptor gene superfamily. *Embo J* 11(3): 1003-1013.
- Ledda-Columbano, G.M., Perra, A., Pibiri, M., Molotzu, F., and Columbano, A. 2005. Induction of pancreatic acinar cell proliferation by thyroid hormone. *The Journal of endocrinology* 185(3): 393-399.
- Lee, J.L., Chang, C.J., Chueh, L.L., and Lin, C.T. 2003. Expression of secreted frizzled-related protein 2 in a primary canine mammary tumor cell line: a candidate tumor marker for mammary tumor cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 39(5-6): 221-227.
- Lee, J.L., Chang, C.J., Wu, S.Y., Sargan, D.R., and Lin, C.T. 2004. Secreted frizzled-related protein 2 (SFRP2) is highly expressed in canine mammary gland tumors but not in normal mammary glands. *Breast cancer research and treatment* 84(2): 139-149.
- Lin, K.H., Shieh, H.Y., Chen, S.L., and Hsu, H.C. 1999. Expression of mutant thyroid hormone nuclear receptors in human hepatocellular carcinoma cells. *Molecular carcinogenesis* 26(1): 53-61.

- Lindqvist, A., van Zon, W., Karlsson Rosenthal, C., and Wolthuis, R.M. 2007. Cyclin B1-Cdk1 activation continues after centrosome separation to control mitotic progression. *PLoS biology* 5(5): e123.
- Logan, C.Y. and Nusse, R. 2004. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annual review of cell and developmental biology* 20: 781-810.
- Lynch, J., Keller, M., Guo, R.J., Yang, D., and Traber, P. 2003. Cdx1 inhibits the proliferation of human colon cancer cells by reducing cyclin D1 gene expression. *Oncogene* 22(41): 6395-6407.
- Markowitz, S., Haut, M., Stellato, T., Gerbic, C., and Molkenin, K. 1989. Expression of the ErbA-beta class of thyroid hormone receptors is selectively lost in human colon carcinoma. *J Clin Invest* 84(5): 1683-1687.
- Miller, L.D., Park, K.S., Guo, Q.M., Alkharouf, N.W., Malek, R.L., Lee, N.H., Liu, E.T., and Cheng, S.Y. 2001. Silencing of Wnt signaling and activation of multiple metabolic pathways in response to thyroid hormone-stimulated cell proliferation. *Mol Cell Biol* 21(19): 6626-6639.
- Mirotsov, M., Zhang, Z., Deb, A., Zhang, L., Gneccchi, M., Noiseux, N., Mu, H., Pachori, A., and Dzau, V. 2007. Secreted frizzled related protein 2 (Sfrp2) is the key Akt-mesenchymal stem cell-released paracrine factor mediating myocardial survival and repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(5): 1643-1648.
- Natsume, H., Sasaki, S., Kitagawa, M., Kashiwabara, Y., Matsushita, A., Nakano, K., Nishiyama, K., Nagayama, K., Misawa, H., Masuda, H., and Nakamura, H. 2003. Beta-catenin/Tcf-1-mediated transactivation of cyclin D1 promoter is negatively regulated by thyroid hormone. *Biochemical and biophysical research communications* 309(2): 408-413.

- Papi, G., Uberti, E.D., Betterle, C., Carani, C., Pearce, E.N., Braverman, L.E., and Roti, E. 2007. Subclinical hypothyroidism. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 14(3): 197-208.
- Pasquini, J.M. and Adamo, A.M. 1994. Thyroid hormones and the central nervous system. *Developmental neuroscience* 16(1-2): 1-8.
- Pinto, D. and Clevers, H. 2005. Wnt, stem cells and cancer in the intestine. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* 97(3): 185-196.
- Pinto, D., Gregorieff, A., Begthel, H., and Clevers, H. 2003. Canonical Wnt signals are essential for homeostasis of the intestinal epithelium. *Genes & development* 17(14): 1709-1713.
- Plateroti, M., Chassande, O., Fraichard, A., Gauthier, K., Freund, J.N., Samarut, J., and Keding, M. 1999. Involvement of T3Ralpha- and beta-receptor subtypes in mediation of T3 functions during postnatal murine intestinal development. *Gastroenterology* 116(6): 1367-1378.
- Plateroti, M., Gauthier, K., Domon-Dell, C., Freund, J.N., Samarut, J., and Chassande, O. 2001. Functional interference between thyroid hormone receptor alpha (TRalpha) and natural truncated TRDeltaalpha isoforms in the control of intestine development. *Mol Cell Biol* 21(14): 4761-4772.
- Plateroti, M., Kress, E., Mori, J.I., and Samarut, J. 2006. Thyroid hormone receptor alpha1 directly controls transcription of the beta-catenin gene in intestinal epithelial cells. *Mol Cell Biol* 26(8): 3204-3214.
- Plateroti, M., Kress, E., and Samarut, J. 2007. Specific actions of thyroid hormones during gut development: insights from animal models. *Journal of pediatric endocrinology & metabolism* 20: 119-122.

- Rose, D.P. and Davis, T.E. 1981. Plasma thyronine levels in carcinoma of the breast and colon. *Arch Intern Med* 141(9): 1161-1164.
- Schlossmann, J., Feil, R., and Hofmann, F. 2005. Insights into cGMP signalling derived from cGMP kinase knockout mice. *Front Biosci* 10: 1279-1289.
- Shtutman, M., Zhurinsky, J., Simcha, I., Albanese, C., D'Amico, M., Pestell, R., and Ben-Ze'ev, A. 1999. The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(10): 5522-5527.
- Stappenbeck, T.S., Hooper, L.V., Manchester, J.K., Wong, M.H., and Gordon, J.I. 2002. Laser capture microdissection of mouse intestine: characterizing mRNA and protein expression, and profiling intermediary metabolism in specified cell populations. *Methods in enzymology* 356: 167-196.
- Stappenbeck, T.S., Wong, M.H., Saam, J.R., Mysorekar, I.U., and Gordon, J.I. 1998. Notes from some crypt watchers: regulation of renewal in the mouse intestinal epithelium. *Curr Opin Cell Biol* 10(6): 702-709.
- Taipale, J. and Beachy, P.A. 2001. The Hedgehog and Wnt signalling pathways in cancer. *Nature* 411(6835): 349-354.
- Tata, J.R. 2006. Amphibian metamorphosis as a model for the developmental actions of thyroid hormone. *Molecular and cellular endocrinology* 246(1-2): 10-20.
- Uren, A., Reichsman, F., Anest, V., Taylor, W.G., Muraiso, K., Bottaro, D.P., Cumberledge, S., and Rubin, J.S. 2000. Secreted frizzled-related protein-1 binds directly to Wingless and is a biphasic modulator of Wnt signaling. *The Journal of biological chemistry* 275(6): 4374-4382.
- van de Wetering, M., Sancho, E., Verweij, C., de Lau, W., Oving, I., Hurlstone, A., van der Horn, K., Batlle, E., Coudreuse, D., Haramis, A.P., Tjon-Pon-Fong, M., Moerer, P.,



- van den Born, M., Soete, G., Pals, S., Eilers, M., Medema, R., and Clevers, H. 2002. The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell* 111(2): 241-250.
- Wang, C.S., Lin, K.H., and Hsu, Y.C. 2002. Alterations of thyroid hormone receptor alpha gene: frequency and association with Nm23 protein expression and metastasis in gastric cancer. *Cancer Lett* 175(2): 121-127.
- Wang, H.Y. 2004. WNT-frizzled signaling via cyclic GMP. *Front Biosci* 9: 1043-1047.
- Weiser, M.M. 1973a. Intestinal epithelial cell surface membrane glycoprotein synthesis. I. An indicator of cellular differentiation. *The Journal of biological chemistry* 248(7): 2536-2541.
- . 1973b. Intestinal epithelial cell surface membrane glycoprotein synthesis. II. Glycosyltransferases and endogenous acceptors of the undifferentiated cell surface membrane. *The Journal of biological chemistry* 248(7): 2542-2548.
- Wilson, G.R. and Curry, R.W., Jr. 2005. Subclinical thyroid disease. *American family physician* 72(8): 1517-1524.
- Yen, P.M., Ando, S., Feng, X., Liu, Y., Maruvada, P., and Xia, X. 2006. Thyroid hormone action at the cellular, genomic and target gene levels. *Molecular and cellular endocrinology* 246(1-2): 121-127.
- Yen, P.M., Feng, X., Flamant, F., Chen, Y., Walker, R.L., Weiss, R.E., Chassande, O., Samarut, J., Refetoff, S., and Meltzer, P.S. 2003. Effects of ligand and thyroid hormone receptor isoforms on hepatic gene expression profiles of thyroid hormone receptor knockout mice. *EMBO reports* 4(6): 581-587.

## Figure Legends

**Figure 1.** Validation of microarray data by RT-QPCR on RNA from intestinal crypts. A-C) Example of differentially regulated genes by altered TH status or TR mutation. We used the multiplex method to analyze the levels of specific mRNAs normalized by the 36B4 mRNA levels. The values are expressed by fold change, as normalized by the WT control condition. Histograms illustrate means  $\pm$  standard deviations. *Ccnb1* and *Mad2L1* are TH-positively regulated genes. *Prkg2* is regulated in a negative manner. D) Comparison between fold change values obtained by microarray or by RT-QPCR in several genes differentially regulated. It is worth noting the same tendency of gene regulation in all the examples. WT-C: wild type control; WT-PTU, wild type PTU-treated; WT-TH, wild type TH-injected. Statistical analysis was conducted by using two-tailed Student t-test. \*:  $P < 0.05$  and \*\*:  $P < 0.001$ , by comparison with WT-C condition. \$:  $P < 0.05$  and \$\$:  $P < 0.001$ , by comparison with WT-PTU and  $TR\alpha^{0/0}$  conditions.

**Figure 2.** Gene ontology analysis for significantly changed transcripts by Ingenuity Pathway Analysis. A) Most significantly changed GO terms, illustrated as functional grouping. B) Canonical pathways significantly associated with our differentially regulated genes. C) The molecular relationships between significantly changed transcripts in the identified network “cell cycle/cell proliferation”. This network has a highly significant score of 68. Genes or gene products are represented as nodes, and the connection between genes are supported by information in the Ingenuity Pathways Knowledge Base. The color indicates the up- (red) or down- (green) regulation. Different shapes of nodes represent different functional classes of gene products (rhomboid, enzymes; ovals, transcription factors; triangles, kinases; trapeziums, transport and carrier proteins; and circles, others). \*: validated. \$: non validated.

**Figure 3.** Focus on the regulation *in vivo* and *in vitro* of the frizzled-related sFRP2 gene. A) Validation of microarray data by RT-QPCR on RNA from intestinal crypts. We used the multiplex method to analyze the levels of the sFRP2 mRNA normalized by the 36B4 mRNA levels. The values are expressed by fold change, as normalized by the WT control condition. Histograms illustrate means  $\pm$  standard deviations. (B) Representative Western blot analysis of sFRP2 in epithelial cells fractionated from the villus-crypt axis. The picture is representative of two independent experiments. 1-4 fractions from 1 month-old wild type control animals; 1'-4', fractions from 1 month-old wild type animals injected with TH 24h before sacrifice. We have used 20 ng of recombinant protein (lane Ctr) as positive control. Actin has been used as loading control. C,D) Study of sFRP2 gene regulation by T3 treatment in primary cultures of intestinal epithelium by RT-QPCR analysis. We used the multiplex method to analyze the levels of the sFRP2 mRNA normalized by the 36B4 mRNA levels. The values are expressed as fold change, as normalized by the control condition. Cells were treated by T3 during 24h (C) or 6h (D). Histograms illustrate means  $\pm$  standard deviations from 3 independent experiments, each conducted in duplicate. C) *In vivo* Chromatin immuno-precipitation. Study by conventional PCR of the DNA purified from the different samples before and after ChIP. The picture is representative of two independent experiments. On the right part of each panel is indicated the fragment amplified on the sFRP2 gene or on the promoter of 36B4 gene. sFRP2-TRE, amplification of a DNA fragment comprising the TRE element; sFRP2-1kb and sFRP2-3Kb, amplification of DNA fragments located respectively 1 kb or 3 kb from the TRE. C: pre-immune serum; TR $\alpha$ 1: anti-TR $\alpha$ 1; TR $\beta$ 1: anti-TR $\beta$ 1; SI: starting input; Ctrl PCR: negative control for PCR mix. Statistical analysis was conducted by using two-tailed Student t-test. \*: P<0.05 and \*\*: P<0.001, by comparison with WT-C condition. \$: P<0.05 and \$\$: P<0.001, by comparison with WT-PTU and TR $\alpha$ <sup>0/0</sup> conditions.

**Figure 4.** sFRP2 stabilizes  $\beta$ -catenin *in vitro*. A) Analysis of c-Myc mRNA expression by RT-QPCR in intestinal epithelium primary cultures treated with sFRP2 recombinant protein at the indicated concentrations (ng/ml) for 24h. We used the simplex method to analyze the levels of the c-Myc mRNA. 36B4 mRNA level was used as internal control. The values are expressed by fold change, as normalized by the control untreated cells condition. Histograms illustrate means  $\pm$  standard deviations from two independent experiments. (B) Representative Western blot analysis of activated non-phosphorylated b-catenin in intestinal epithelium primary cultures treated either with T3 or with 50 ng/ml of sFRP2 during 24h. The picture is representative of two independent experiments. Actin has been used as loading control. C) Representative Western blot analysis of sFRP2 in the culture medium of cells treated or untreated with T3 during 24h. 500  $\mu$ g of concentrated proteins from the culture medium were loaded into the gel. We have used 20 ng of recombinant protein (lane Ctr) as positive control. The picture is representative of two independent experiments. D) Analysis of c-Myc mRNA expression by RT-QPCR in intestinal epithelium primary cultures treated or untreated with T3 for 24h. For inhibition experiments we co-treated the cells with T3 and an anti-sFRP2 antibody. We used the simplex method to analyze the levels of the c-Myc mRNA. 36B4 mRNA level was used as internal control. The values are expressed by fold change, as normalized by the control untreated cells condition. Histograms illustrate means  $\pm$  standard deviations from two independent experiments. Statistical analysis was conducted by using two-tailed Student t-test. \*:  $P < 0.05$  and \*\*:  $P < 0.001$ , by comparison with WT-C condition.

**Figure 5.** Immunofluorescence analysis of epithelial primary cultures. A-P) Double staining analysis for b-catenin and BrdU in different culture conditions. The conditions are: control

(A-D), T3 (E-H), sFRP2 (I-L) and (M-P) T3+anti-sFRP2 antibody. All nuclei labelled by Hoechst (A,E,I,M),  $\beta$ -catenin (B,F,J,N), BrdU (C,G,K,O) are shown. In D,H,L,P the pictures show the merging of  $\beta$ -catenin and BrdU stainings. Q,R) Summary (mean $\pm$ SD) of the scoring of specific immunolabelling in three independent experiments, by counting the positive cells under the microscope. Cells were maintained under the indicated culture conditions. For statistical analysis two-tailed Student T-test was used. \*,  $P<0.05$ ; \*\*,  $P<0.001$ . Arrows point to some double-stained nuclei. Magnification: bar=12 $\mu$ m.

**Figure 6.**  $\beta$ -catenin study in wild type animals. A-I) Confocal microscopy analysis after immunolabelling. Sections from euthyroid (A-C) hypothyroid (D-F) and hyperthyroid (G-I) animals were stained with  $\beta$ -catenin antibodies (A,D,G). Nuclei in (B,E,H) were counterstained with propidium iodide. In C,F,I is shown the merging of the two single staining. Note the main localisation of  $\beta$ -catenin at the cell membrane, where it binds to e-cadherin. In order to minimise differences due to the manipulations during the experiment, all the slides have been simultaneously processed and the confocal images taken with same laser settings. Magnification: bar=7 $\mu$ m. H) Representative Western blot analysis of activated non-phosphorylated  $\beta$ -catenin in epithelial cells fractionated from the villus-crypt axis. The picture is representative of two independent experiments. 1-4 fractions from 1 month-old wild type control animals; 1'-4', fractions from 1 month-old wild type animals injected with TH 24h before sacrifice. Actin has been used as loading control.

Table 1. List of the genes regulated by the thyroid hormones in intestinal crypt cells

Probeset ID	Gene symbol	Gene title	Fold change WT THvsPTU	pValue T-Test	TRa0/0 vs WT-C	TRb-/- vs WT-C
<b>Cell cycle control/Proliferation</b>						
1419943_s_at	Ccnb1	Cyclin B1	2.7	0.030139	NC	NC
1417910_at	Ccna2	Cyclin A2	1.6	0.040217	I	NC
1425747_at	Dock5	Dedicator of cytokinesis 5	* 2.1	0.033231	I	I
1416961_at	Bub1b	Budding uninhibited by benzimidazoles1 homolog. b (S. cerevisiae)	1.8	0.018446	NC	NC
1417450_a_at	Tacc3	Transforming. acidic coiled-coil containing protein 3	1.8	0.017313	NC	NC
1422460_at	Mad2l1	MAD2 (mitotic arrest deficient. homolog)-like 1 (yeast)	1.7	0.021923	NC	NC
1424511_at	Aurka	Aurora kinase A	2.2	0.028038	NC	NC
1448314_at	Cdc2a	Cell division cycle 2 homolog A (S. pombe)	1.9	0.036577	NC	NC
1452954_at	Ube2c	Ubiquitin-conjugating enzyme E2C	1.7	0.037546	NC	NC
1433711_s_at	Sesn1	Sestrin 1	2.1	0.008361	NC	NC
1460389_at	Cdk8	Cyclin-dependent kinase 8	* -1.6	0.01865	NC	D
1422016_a_at	Cenph	Centromere protein H	-1.7	0.042143	NC	NC
1417649_at	Cdkn1c	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (P57)	-4.5	0.006459	D	D
<b>Transcriptional regulation</b>						
1423100_at	Fos	FBJ osteosarcoma oncogene	2.1	0.006540	NC	I
1426412_at	Neurod1	Neurogenic differentiation 1	1.5	0.029732	NC	NC
1427969_s_at	Zfp654	Zinc finger protein 654	2.4	0.013881	NC	NC
1425806_a_at	Surb7	SRB7 (suppressor of RNA polymerase B) homolog (S. cerevisiae)	1.9	0.017562	NC	NC
1423714_at	Asf1b	ASF1 anti-silencing function 1 homolog B (S. cerevisiae)	1.8	0.031311	NC	NC
1450842_a_at	Cenpa	Centromere protein A	1.7	0.020274	NC	NC
1422064_a_at	Zbtb20	Zinc finger and BTB domain containing 20	\$ 5	0.038029	I	I
1426690_a_at	Srebf1	Sterol regulatory element binding factor 1	# -1.7	0.022799	NC	NC
1419537_at	Tcfec	Transcription factor EC	* -3.3	0.015734	NC	D
1421078_at	Tcf23	Transcription factor 23	-11.8	0.011751	NC	D
1438802_at	FoxP1	Forkhead box P1. full insert sequence	-2.3	0.006862	NC	NC
1448960_at	Cxxc5	CXXC finger 5	-2	0.036174	NC	NC
1418102_at	Hes1*	Hairy and enhancer of split 1 (Drosophila)	1.5	MS	NC	NC
1450008_a_at	Ctnnb1	Catenin (cadherin associated protein) beta 1	2	0.046459	NC	NC
1422075_at	Cdx2	Caudal type homeo box 2	\$ -1.5	0.03760	NC	D
1424089_a_at	Tcf4	Transcription factor 4	\$ -1.5	0.04992	NC	D
1424985_a_at	Sox10	SRY-box containing gene 10	\$ -2	0.003159	NC	D
1452528_a_at	Nkx2-3	NK2 transcription factor related, locus 3 (Drosophila)	\$ -1.7	0.03516	NC	D
1423029_at	Hes2*	Hairy and enhancer of split 2 (Drosophila)	\$ 2	0.043200	NC	I
1428289_at	Klf9	Kruppel-like factor 9	\$ 1.7	0.033855	NC	I
1421983_s_at	Hnf4a	Hepatic nuclear factor 4, alpha	# -1.7	0.039631	NC	NC
<b>Nucleic Acid Metabolism</b>						
1415878_at	Rrm1	Ribonucleotide reductase M1	1.6	0.033414	NC	NC
1417470_at	Apobec3	Apolipoprotein B editing complex 3	2	0.00733	NC	NC
1452003_at	Rbm14	RNA binding motif protein 14	2.9	0.001631	NC	NC
1419397_at	Pola1	Polymerase (DNA directed). alpha 1	2.1	0.020932	NC	NC
1422603_at	Rnase4	Ribonuclease, RNase A family 4	*-1.8	0.014165	NC	D
1449170_at	Piwi2	Piwi-like homolog 2 (Drosophila)	*-6.6	0.004148	NC	D

1451755_a_at	Apobec1	Apolipoprotein B editing complex 1	1.6	MS	NC	NC
<b><i>Stress and apoptosis</i></b>						
1449279_at	Gpx2	Glutathione peroxidase 2	3.1	0.035890	NC	NC
1450668_s_at	Hspe1	Heat shock protein 1 (chaperonin 10)	1.5	0.044218	NC	NC
1423566_a_at	Hsp110	Heat shock protein 110	3.6	0.016352	NC	NC
1452425_at	Tnfrsf14	Tumor necrosis factor receptor superfamily. member 14	*2.7	0.036961	I	NC
1437051_at	Dffb	DNA fragmentation factor. beta subunit	\$ 3.2	0.009283	I	I
1420919_at	Sgk3	Serum/glucocorticoid regulated kinase 3	*-2	0.003905	NC	D
1428306_at	Ddit4	DNA-damage-inducible transcript 4	-1.7	0.004154	I	NC
1425428_at	Hif3a	Hypoxia inducible factor 3. alpha subunit	-3.5	0.006634	NC	NC
1416430_at	Cat	catalase	-2.1	0.006426	NC	D
<b><i>Cell Signaling</i></b>						
1422781_at	Tlr3	Toll-like receptor 3	\$ 8.3	0.033471	NC	I
1418534_at	Fzd2	Frizzled homolog 2 (Drosophila)	1.8	0.023572	NC	NC
1450649_at	Gng10	Guanine nucleotide binding protein (G protein). gamma 10	2.3	0.000882	NC	NC
1448201_at	sFRP2	Secreted frizzled-related protein 2	23	0.000213	NC	I
1433725_at	Acvr1b	Activin A receptor type 1B	*-2	0.019161	NC	NC
1426452_a_at	Rab30	RAB30. member RAS oncogene family	-3	0.011719	NC	D
1419873_s_at	Csf1r	Colony stimulating factor 1 receptor	*-1.8	0.047604	NC	D
1451924_a_at	Edn1	Endothelin 1	*-2.7	0.026163	NC	D
1423136_at	Fgf1	Fibroblast growth factor 1	-2	0.035855	NC	NC
1425187_at	Sel1	Sel-1 suppressor of lin-12-like (C. elegans)	-1.7	0.018776	NC	NC
1435627_x_at	Marcks11	MARCKS-like 1	-3.1	0.000693	NC	NC
1428714_at	Pgrmc2	Progesterone receptor membrane component 2	-1.8	0.002464	NC	NC
1418910_at	Bmp7	Bone morphogenetic protein 7	*-2.7	0.009384	D	D
1435394_s_at	Rhoc	Ras homolog gene family. member C	*-1.4	0.033102	NC	NC
1418634_at	Notch1	Notch gene homolog 1 (Drosophila)	2	MS	NC	NC
1451889_at	Notch2	Notch gene homolog 2 (Drosophila)	2	0.004531	NC	NC
1450978_at	Dvl1	Dishevelled 1, dsh homolog (Drosophila)	1.5	MS	NC	NC
1446086_s_at	Gli2	GLI-Kruppel family member GLI2	\$ -2	0.00518	NC	D
1424050_s_at	Fgfr1	Fibroblast growth factor receptor 1	\$ -1.5	0.03559	NC	D
1451693_a_at	Fgf12	Fibroblast growth factor 12	\$ -2	0.002243	NC	D
1451912_a_at	Fgfr1l	Fibroblast growth factor receptor-like 1	\$ -1.6	0.02759	NC	D
1460420_a_at	Egfr	Epidermal growth factor receptor	\$ -1.5	0.03111	NC	D
1417312_at	Dkk3	Dickkopf homolog 3 (Xenopus laevis)	\$ 1.7	0.02745	NC	I
1421928_at	Epha4	Eph receptor A4	\$ 1.5	0.01764	NC	I
1439373_x_at	Wnt5b	Wingless-related MMTV integration site 5B	\$ 1.8	0.02655	NC	I
1423635_at	Bmp2	Bone morphogenetic protein 2	* -1.8	0.03581	NC	I
1456174_x_at	Ndrp	N-myc downstream regulated gene 1	-2.8	0.000201	NC	NC
<b><i>Metabolism</i></b>						
1417308_at	Pkm2	Pyruvate kinase. muscle	2.1	0.002206	NC	NC
1421041_s_at	Gsta1	Glutathione S-transferase. alpha 1 (Ya)	1.8	0.004492	NC	NC
1421522_at	Galgt2	Galactosyl-N-acetylglucosaminylpolypeptide-beta-1, 4-N-acetylgalactosaminyltransferase	2.7	0.002603	NC	NC
1422479_at	Acss2	Acyl-CoA synthetase short-chain family member 2	1.6	0.047068	NC	NC
1422501_s_at	Idh3a	Isocitrate dehydrogenase 3 (NAD+) alpha	* 1.9	0.01149	NC	NC
1423565_at	Paics	Phosphoribosylaminoimidazole carboxylase	* 2.2	0.001312	NC	NC
1424048_a_at	Cyb5r1	Cytochrome b5 reductase 1	* 2.2	0.020287	NC	NC
1426440_at	Dhrs7	Dehydrogenase/reductase (SDR family) member 7	* 1.9	0.020287	NC	NC

1430307_a_at	Mod1	Malic enzyme supernatant	* 1.8	0.038980	NC	NC
1438627_x_at	Pgd	Phosphogluconate dehydrogenase	* 2.2	0.001331	NC	NC
1448562_at	Upp1	Uridine phosphorylase 1	6.7	0.024943	NC	NC
1416570_s_at	Gfm1	G elongation factor mitochondrial 1	* 2.3	0.004681	I	NC
1422962_a_at	Psmb8	Proteosome (prosome, macropain) subunit, beta type 8	2.3	0.016066	NC	NC
1433702_at	D19Wsu12e	DNA segment. Chr 19. Wayne State University 12. expressed	2	0.012063	NC	NC
1452925_a_at	March5	Membrane-associated ring finger (C3HC4) 5	1.8	0.030231	NC	NC
1415695_at	Psmal1	Proteasome (prosome. macropain) subunit. alpha type 1	1.8	0.009244	NC	NC
1417403_at	Elov16	ELOVL family member 6. elongation of long chain fatty acids (yeast)	1.6	0.039290	NC	NC
1455832_a_at	Umps	Uridine monophosphate synthetase	1.6	0.003857	NC	NC
1416468_at	Aldh1a1	Aldehyde dehydrogenase family 1. subfamily A1	-4.7	0.010778	NC	NC
1416617_at	Acsc1	Acyl-CoA synthetase short-chain family member 1	-1.7	0.000187	NC	NC
1417111_at	Man1a	Mannosidase 1. alpha	-1.7	0.003044	NC	D
1417987_at	Btd	Biotinidase	-2.2	0.022934	NC	NC
1418486_at	Vnn1	Vanin 1	-2.7	0.012759	NC	NC
1418601_at	Aldh1a7	Aldehyde dehydrogenase family 1. subfamily A7	-3.6	0.010204	I	NC
1418672_at	Akr1c13	Aldo-keto reductase family 1. member C13	-1.9	0.003246	NC	D
1438711_at	Pklr	Pyruvate kinase liver and red blood cell	-1.7	0.038030	NC	D
1421969_a_at	Faah	Fatty acid amide hydrolase	-2.2	0.040980	NC	NC
1422822_at	Stard5	STAR-related lipid transfer (START) domain containing 5	-2.6	0.029870	NC	NC
1425503_at	Gcnt2	Glucosaminyl (N-acetyl) transferase 2. I-branching enzyme	-1.7	0.046182	NC	D
1431833_a_at	Hmgcs2	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 2	-3	0.002837	NC	NC
1433613_at	Pank3	Pantothenate kinase 3 (Pank3), mRNA	-1.7	0.012940	NC	NC
1448104_at	Aldh6a1	Aldehyde dehydrogenase family 6. subfamily A1	-1.6	0.030258	NC	NC
1448723_at	Rdh7	Retinol dehydrogenase 7	-8.3	0.006697	NC	NC
1449065_at	Acot1	Acyl-CoA thioesterase 1	-3.7	0.000099	NC	D
1449374_at	Pipox	Pipecolic acid oxidase	-2.2	0.028861	NC	NC
1435162_at	Prkg2	Protein kinase. cGMP-dependent. type II	* -2.6	0.012359	NC	NC
1435855_x_at	Aldh18a1	Aldehyde dehydrogenase 18 family, member A1	-1.5	0.017145	NC	I
1455908_a_at	Scpep1	Serine carboxypeptidase 1	* -1.8	0.000157	NC	NC
1456728_x_at	Aco1	Aconitase 1	* -1.8	0.039859	NC	NC
1416225_at	Adh1	Alcohol dehydrogenase 1 (class I)	-1.9	0.007762	NC	NC
1416239_at	Ass1	Argininosuccinate synthetase 1	-2.2	0.029549	NC	NC
1422703_at	Gyk	Glycerol kinase	-1.8	0.040597	NC	NC
1424835_at	Gstm4	Glutathione S-transferase. mu 4	-1.9	0.036589	NC	NC
1427474_s_at	Gstm3	Glutathione S-transferase. mu 3	-3.4	0.007003	NC	D
1452060_a_at	Limk2	LIM motif-containing protein kinase 2	* -1.8	0.014636	NC	NC
1419104_at	Abhd6	Abhydrolase domain containing 6	1.7	0.011343	NC	NC
1430173_x_at	Cyp4f16	cytochrome P450. family 4. subfamily f. polypeptide 16	* -2.2	0.043226	NC	NC
1426423_at	Shmt2	Serine hydroxymethyl transferase 2 (mitochondrial)	* 2	0.011056	NC	D
1416547_at	Ndufb3	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex 3	1.8	0.019153	NC	NC
1448188_at	Ucp2	Uncoupling protein 2 (mitochondrial. proton carrier)	1.8	0.01352	NC	NC
1420826_at	Letm1	Leucine zipper-EF-hand containing transmembrane protein 1	2.4	0.002204	I	NC
1419253_at	Mthfd2	Methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NAD+ dependent)	* 1.9	0.020560	NC	I



1417286_at	Ndufa5	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 5	1.7	0.015248	NC	NC
1422484_at	Cycs	Cytochrome c. somatic	* 1.6	0.018448	NC	NC
1416105_at	Nnt	Nicotinamide nucleotide transhydrogenase	-2	0.011531	NC	NC
1419656_at	Slc25a36	Solute carrier family 25. member 36	* -2	0.002388	D	D

#### *Cell adhesion/Extracellular matrix*

1415871_at	Tgfb1	Transforming growth factor. beta induced	3.5	0.007119	NC	NC
1422977_at	Gp1bb	Glycoprotein Ib. beta polypeptide	* 1.5	0.039992	I	NC
1448416_at	Mgp	Matrix Gla protein	3.2	0.026692	NC	NC
1427308_at	Dab1	Disabled homolog 1 (Drosophila	* -1.7	0.000795	NC	NC
1449091_at	Cldn8	Claudin 8	-3.2	0.017766	D	D
1425823_at	Cfh	Complement component factor h	-5.5	0.001005	NC	D
1427440_a_at	Afm	Afamin	* -2.6	0.026597	D	D
1424279_at	Fga	Fibrinogen. alpha polypeptide	* -3.7	0.043327	NC	D
1451580_a_at	Ttr	Transthyretin	* -2.6	0.017516	NC	D
1417920_at	Amn	Amnionless	* -3.1	0.000032	D	D

#### *Membrane proteins/Transporters*

1422906_at	Abcg2	ATP-binding cassette. sub-family G (WHITE). member 2	* -2	0.004974	NC	D
1451532_s_at	Steap1	Six transmembrane epithelial antigen of the prostate 1	2	0.034690	NC	NC
1416480_a_at	Higd1a	HIG1 domain family. member 1A	2.3	0.029349	NC	NC
1449893_a_at	Lrig1	Leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains 1	1.8	0.047950	NC	NC
1418499_a_at	Kcne3	Potassium voltage-gated channel. Isk-related subfamily. gene 3	2.4	0.010377	NC	NC
1431379_a_at	Slc13a1	Solute carrier family 13 (sodium/sulphate symporters). member 1	6.1	0.008675	NC	NC
1448550_at	Lbp	Lipopolysaccharide binding protein	9.5	0.000877	NC	NC
1423090_x_at	sec61g	SEC61. gamma subunit	1.8	0.027313	NC	NC
1416014_at	Abce1	ATP-binding cassette. sub-family E (OABP). member 1	1.5	0.042551	NC	NC
1417268_at	Cd14	CD14 antigen	5.5		NC	NC
1426566_s_at	Il17re	Interleukin 17 receptor E	3.2	0.021256	NC	I
1423307_s_at	Tgoln1	Trans-golgi network protein /// trans-golgi network protein 2	* -2	0.001871	D	D
1435537_at	Ptpd	Protein tyrosine phosphatase. receptor type. D	-2.2	0.006453	NC	NC
1416274_at	Ctns	Cystinosis. Nephropathic	-2.2	0.028911	NC	D
1417415_at	Slc6a3	Solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter. dopamine). member 3	-4	0.008607	NC	D
1424959_at	Anxa13	Annexin A13	-2.8	0.000932	NC	NC
1426595_at	Slc18a1	Solute carrier family 18 (vesicular monoamine). member 1	-2	0.007966	NC	NC
1419758_at	Abcb1a	ATP-binding cassette. sub-family B (MDR/TAP). member 1A	* -2.6	0.040262	D	D
1417689_a_at	Pdzk1ip1	PDZK1 interacting protein 1	* -4.4	0.000363	D	D
1425914_a_at	Armxc1	Armadillo repeat containing. X-linked 1	* -2.2	0.009287	NC	D

#### *Miscellaneous*

1424210_at	Spfh1	SPFH domain family. member 1	-2	0.004072	NC	NC
1421709_a_at	Fmo5	Flavin containing monooxygenase 5	* -2.4	0.017112	NC	NC
1422608_at	Arpp19	cAMP-regulated phosphoprotein 19	1.6	0.003723	NC	NC

1435323_a_at	Oact1	O-acyltransferase (membrane bound) domain containing 1	2.3	0.005548	NC	NC
1433628_at	Gm1	Gene model 1, (NCBI)	* 3.5	0.046042	NC	NC
1448682_at	Dnclc1	Dynein, cytoplasmic, light chain 1	2	0.001218	I	NC
1422644_at	Sh3bgr	SH3-binding domain glutamic acid-rich protein	5.1	0.001026	NC	NC
1450692_at	Kif4	Kinesin family member 4	2.1	0.003611	NC	NC
1422780_at	Pxmp4	Peroxisomal membrane protein 4	-2	0.002849	NC	D
1438610_a_at	Cryz	Crystallin. Zeta	* -3.4	0.001347	NC	NC
1434513_at	Atp13a3	ATPase type 13A3	* -1.6	0.048005	NC	NC
1423726_at	Vat1	Vesicle amine transport protein 1 homolog (T californica)	-2.3	0.033141	NC	NC
1450441_at	Lrrc50	Leucine rich repeat containing 50	-2.5	0.004269	NC	NC
1451724_at	Ankmy2	Ankyrin repeat and MYND domain containing 2	# -3.3	0.012174	NC	NC
1450716_at	Adamts1	A disintegrin-like and metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif. 1	# -3.3	0.002989	NC	I
1420498_a_at	Dab2	Disabled homolog 2 (Drosophila)	* -2.5	0.04442	NC	NC

\*: Comparison WT-TH vs WT-C

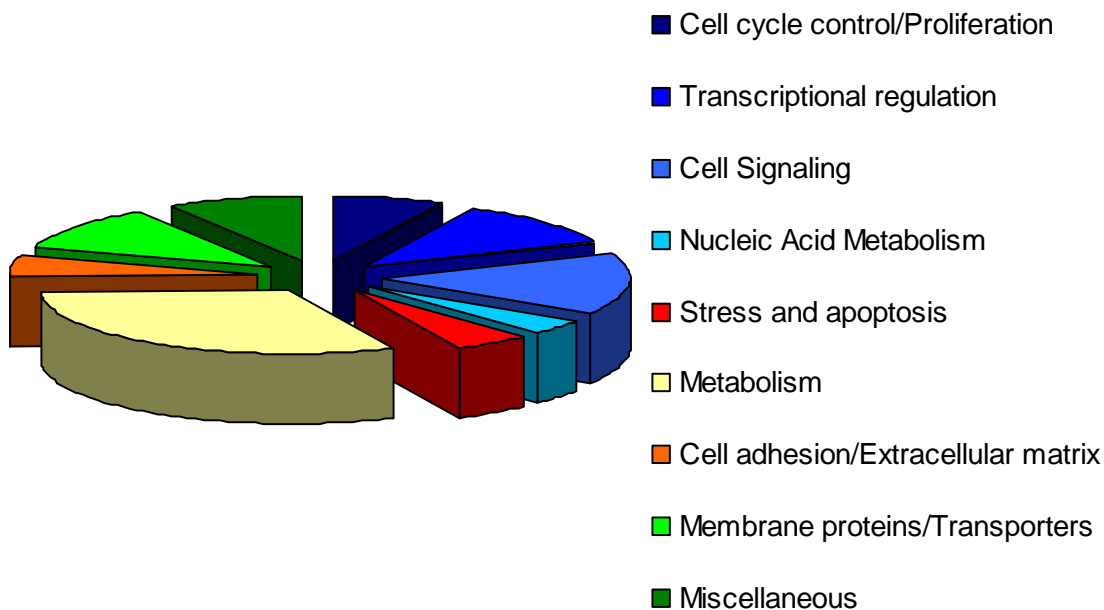
\$: Comparison TRb-/- vs WT-C

#: Comparison WT-PTU vs WT-C

NC: not changed

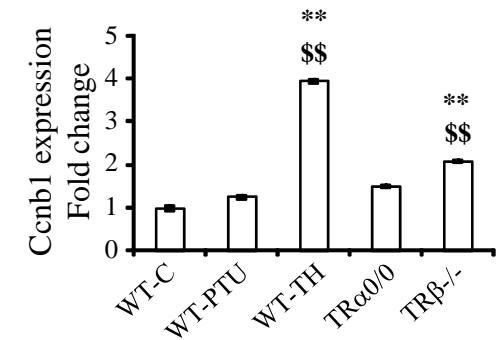
I: increased

D: decreased

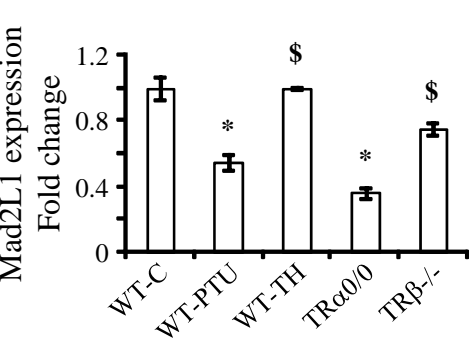


Kress et al. Figure 1

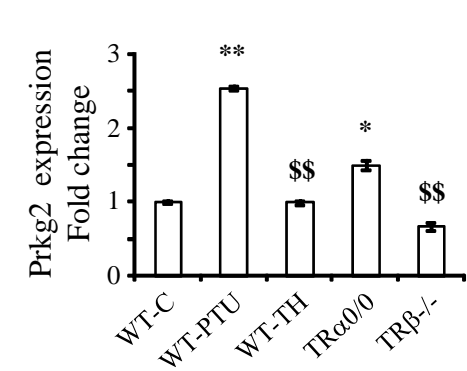
A



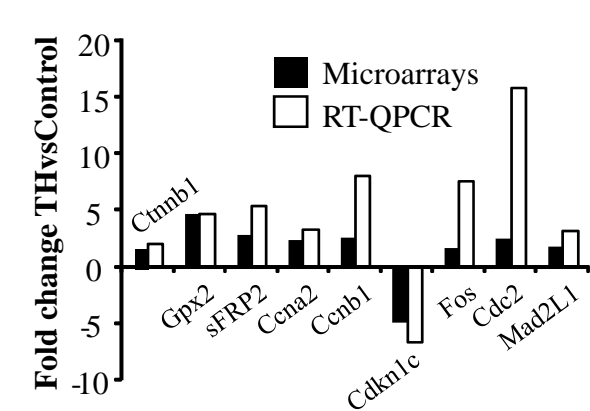
B



C

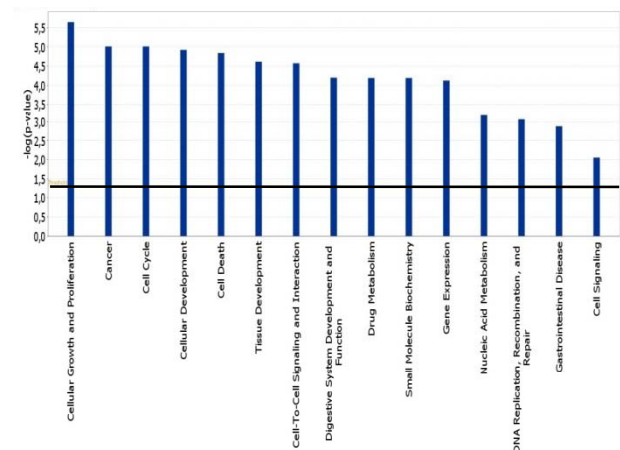


D

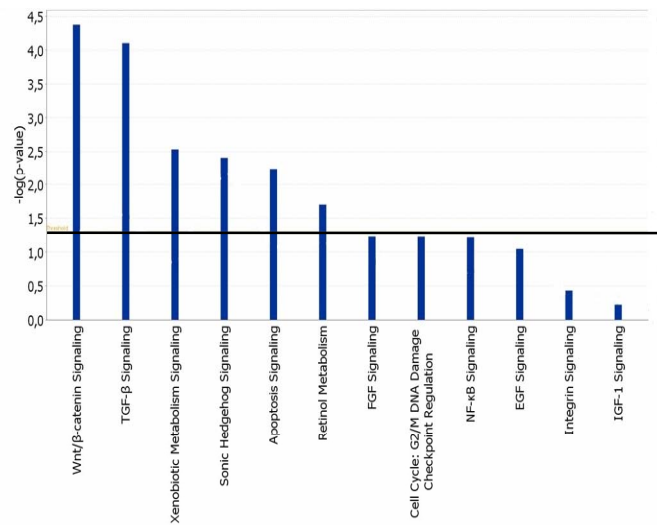


Kress et al. Figure 2

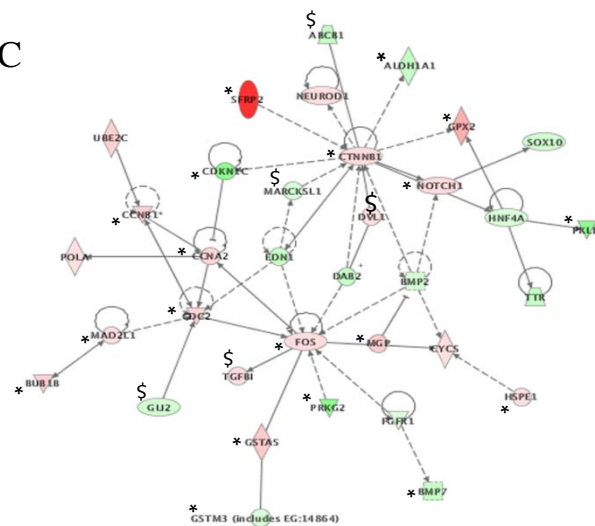
A



B

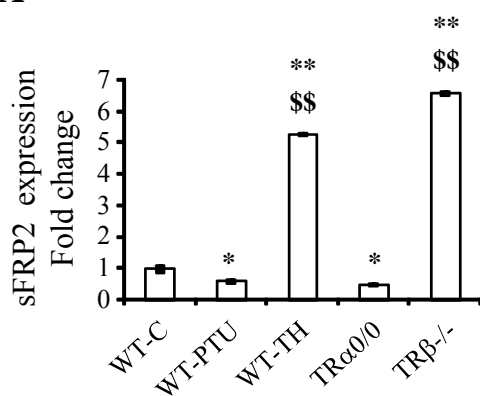


C

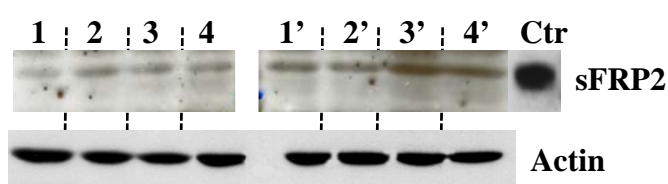


Kress et al. Figure 3

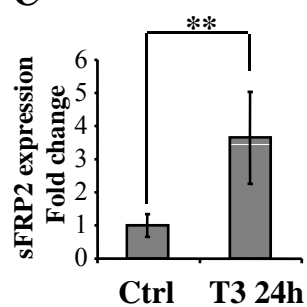
**A**



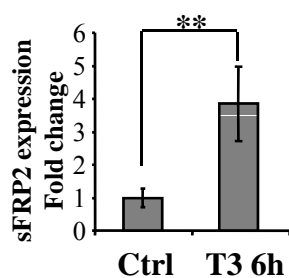
**B**



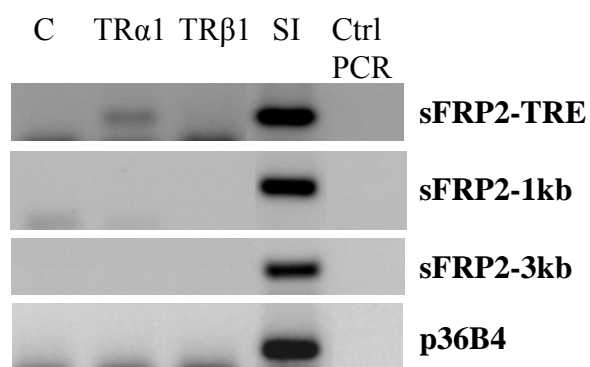
**C**



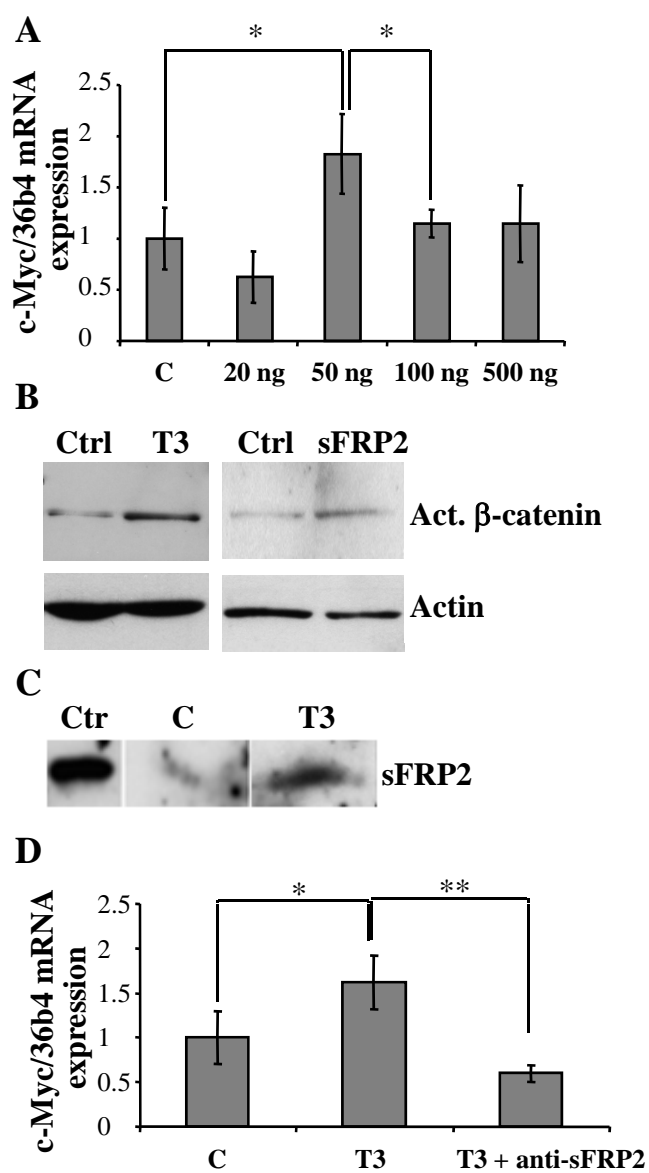
**D**



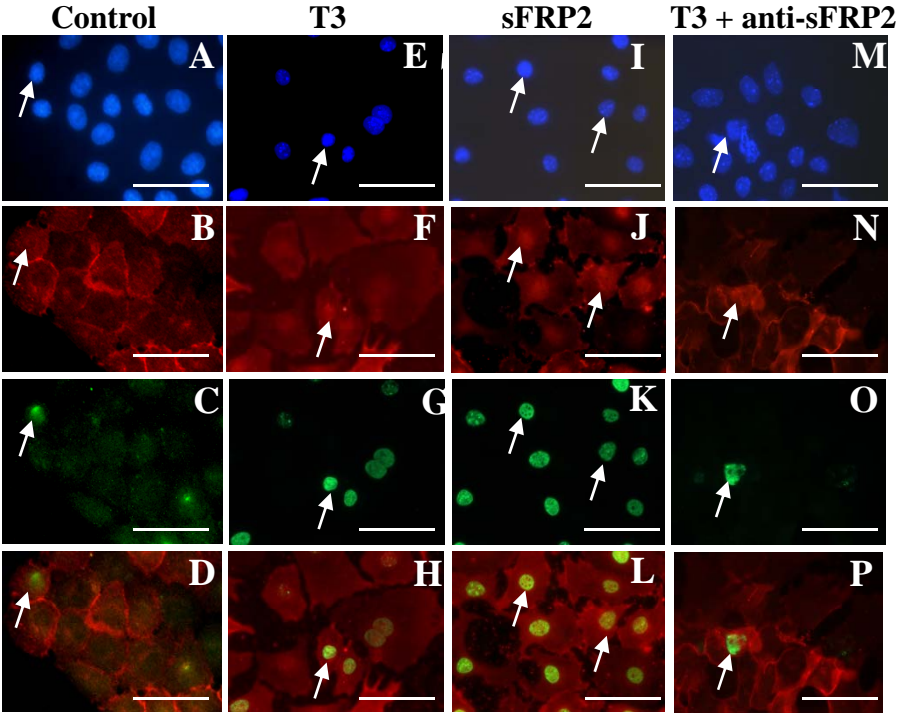
**E**



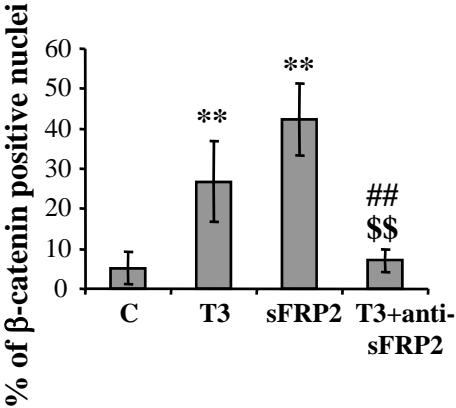
Kress et al. Figure 4



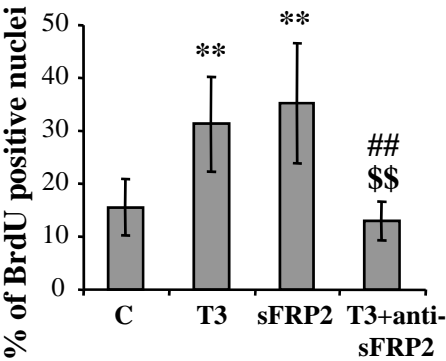
Kress et al. Figure 5



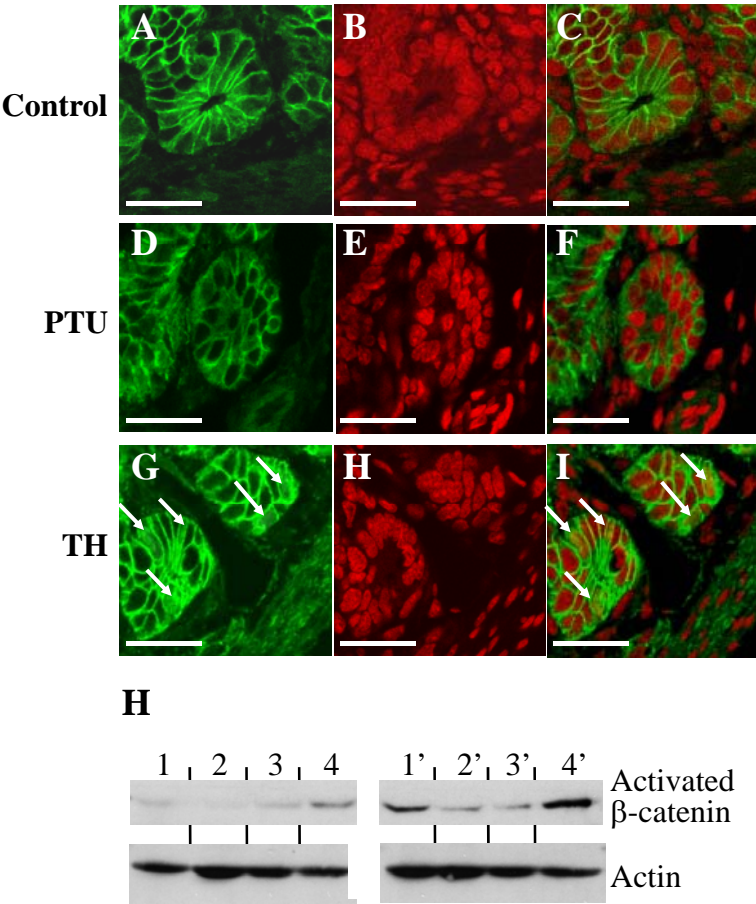
Q



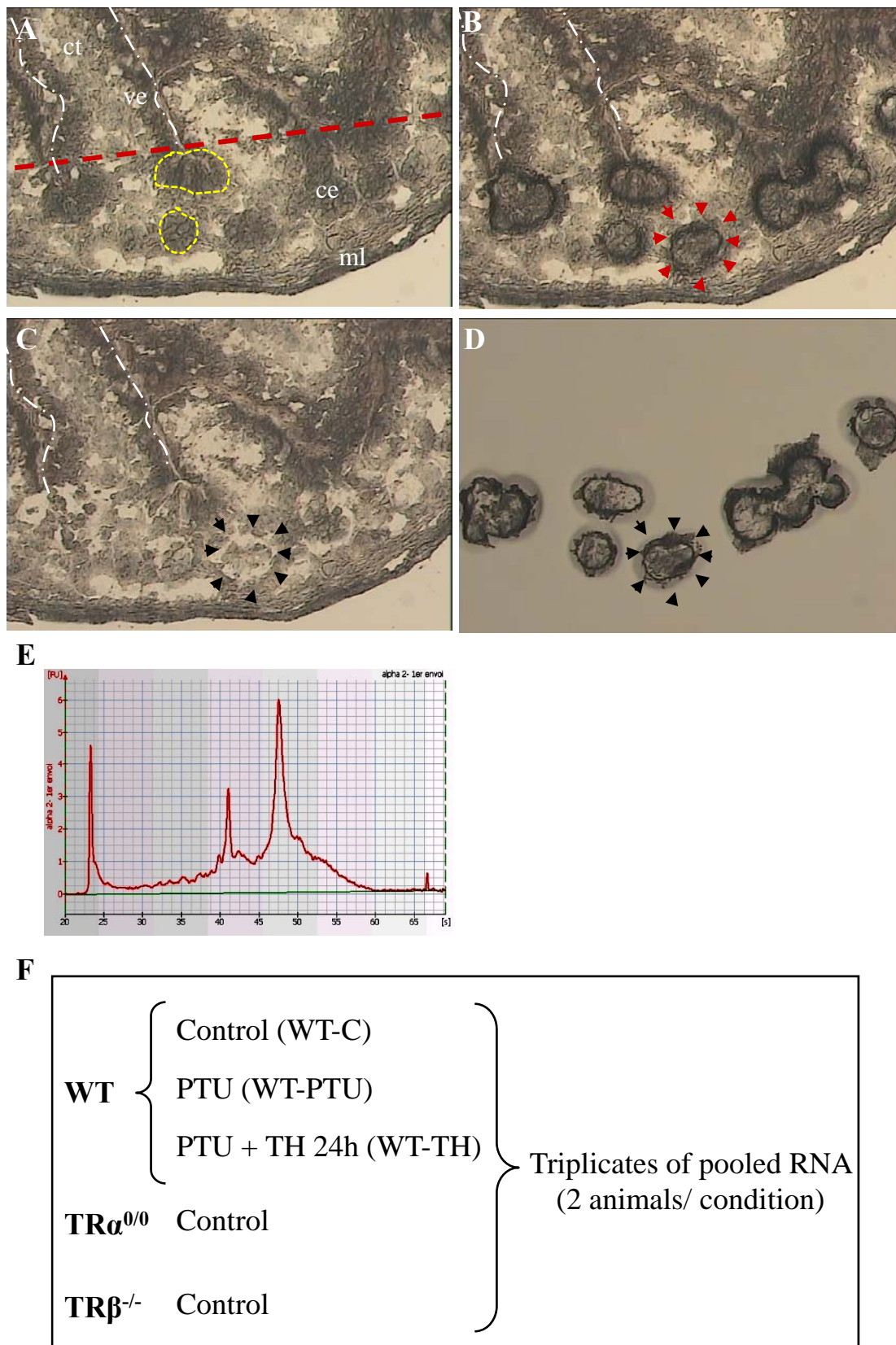
R



Kress et al. Figure 6

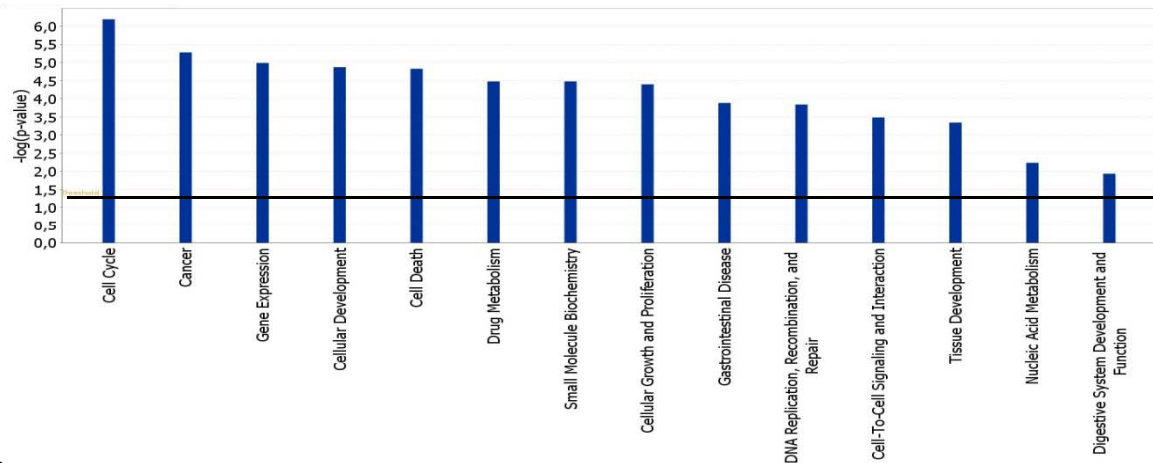




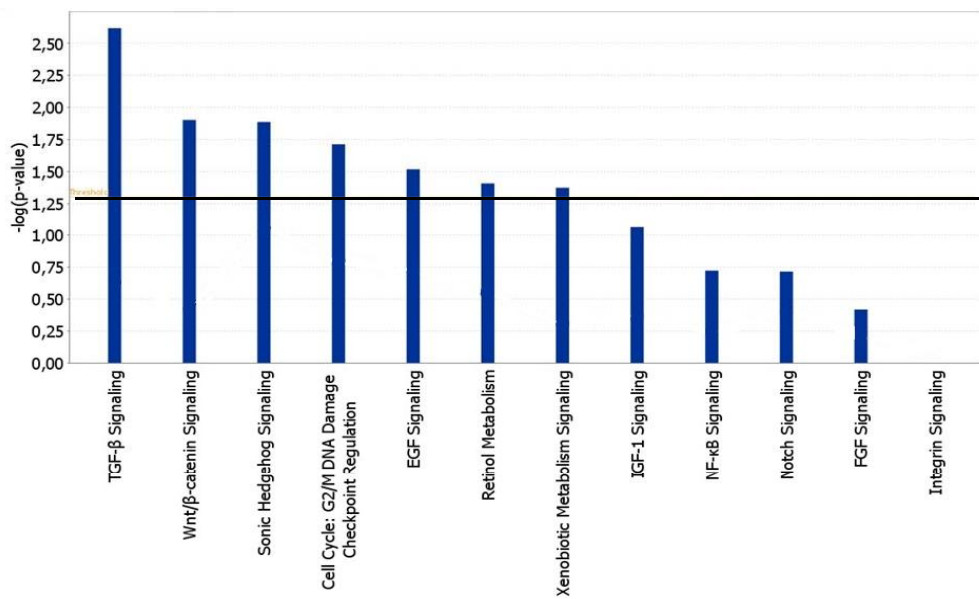


**Figure S1.** Isolation of intestinal crypt cells. A-D) Different steps of the laser microdissection. Crypt cells from colored frozen sections of mouse intestine (A) received specifically laser pulses (B). After removing the caps, the crypt cells were no more present in the sections (C), but were on the caps (D). Crypts in A are surrounded by yellow dots. One villus in A-C is delimited by white dots. The red line in A delimits the crypt compartment. E) Typical quality profile of the RNA extracted from the laser microdissected crypt cells, analyzed by capillary electrophoresis (Agilent apparatus. F) Experimental plan and animal used for the whole experiment.

**A**



**B**



**Figure S2.** Gene ontology analysis for significantly changed transcripts by Ingenuity Pathway Analysis, after validation by RT-QPCR. A) Most significantly changed GO terms, illustrated as functional grouping. B) Canonical pathways significantly associated with our differentially regulated genes.

A

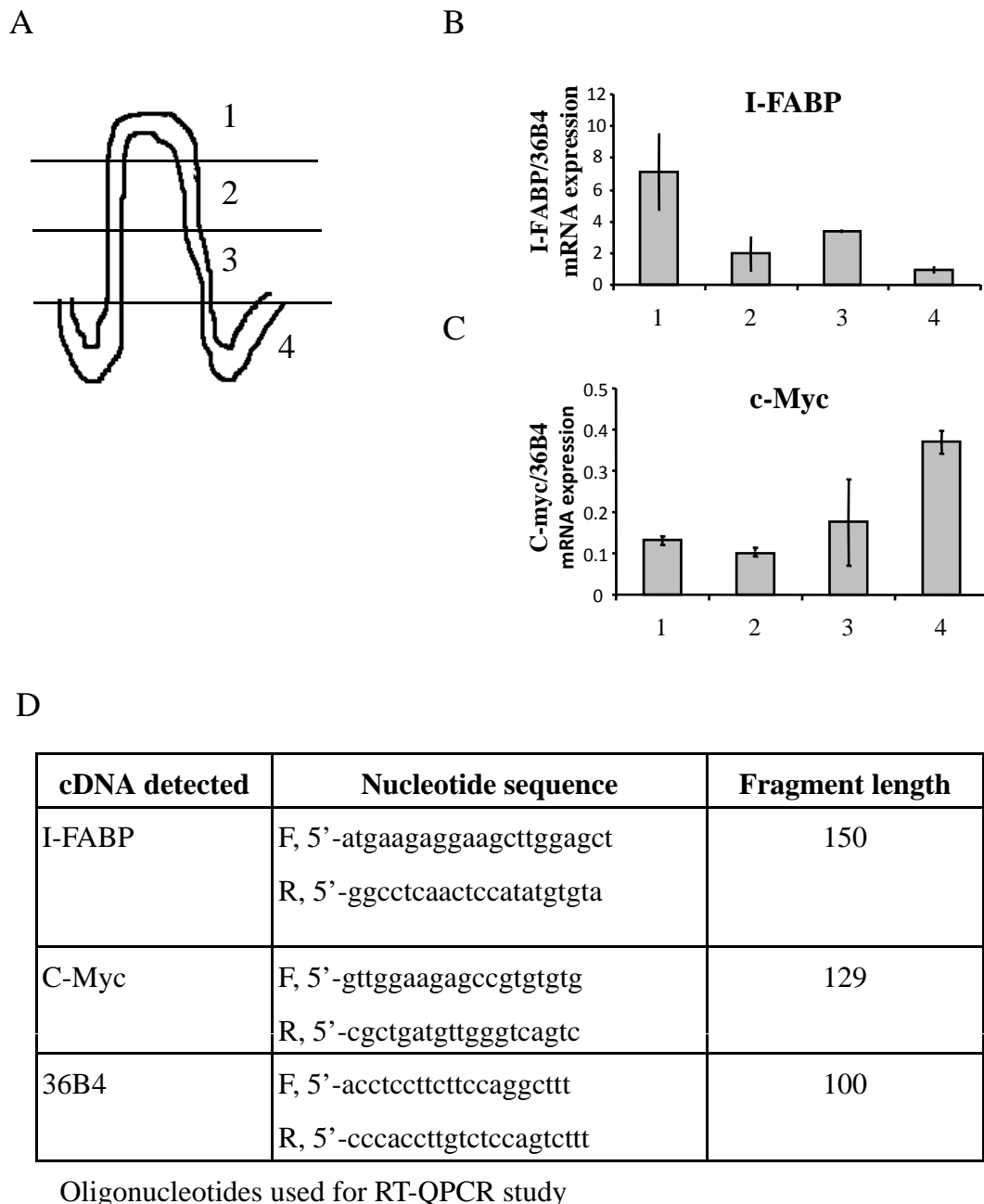
sFRP2 gene  
5' GCAACCCCCCCCCCTTAACCCACCCCCTGCGCACGTCCAAACTGTCTCTGTACTCCTTTCCCCG  
CCTGGCACCTTACAATCCACTTACCCTAACATTAGGTTCCCTGTTCTACAGAGCAGAGGATGGCCCG  
ATGGG**TGACCA**GGATGGCG**TGACCA**GGATGGGTGACCAGGATGGCGTCCCTGGTTGTTAGGGGATGAATG  
GGCCAACCTATGCTGAGGACATGACTAACTCTTGTGACCACAGAGGTCTCTGCCCCGTTCTGCCCCACC  
TTCTGACCTTGGTACTCATAAGCCCCATTTATTGCTTTGGTGGCCTATACTGAGGTAATCCTGAACC  
CCTATGTATTAGAGCCCGTGCAGCCTTCAAGCATAGACATCTCTTCAGAGGTCAAATTTTCTCCTCC  
AAAGAGGAGAAATGGCGGGCAAATTCGTGATGCCTCTGACAAGTCCTCCACAGTGACAAAATCCTAT  
AGACACCCAGCAAATAGCAACTCCGTGCATGGCTGCAATTCCATTTTATAAGTCAGAATGTGTCTG  
TGAGGCTGTGGAATCACATTGCTCAAGCCAGTCTGCTCAACTTGGGCTGGAGAACCAGGGAGGAAAA  
GCCCAGGCCACAAAGAGTCTAGTACTGCTGGTTTATGGTTACTCGGGGACAGGGACGCAGTGCTGAG  
ACTTAAAGGCTGCTGCACATCGATACGGGCGCAGGCCACGCGGGGCGTGAAACGCGTTCCAGCCCTG  
ATCCGACTGCAAGGCAGCTAGCCCGGCTCCACGCGTGTCTCGACTTTCGTTGCCTCCTCCTCGCTC  
TCCCCTCGCTCTCCCTGGGACAGGGTGGCCCGCGCTTGTCTGCTTGCAAGGCAATCACCAGAGCGCG  
CGCGCAGGGGCTGCTGCCTCGGGGTGGGGGCGCAGCCCGAATTTCTGCCAGCGAGCGCGTGAGGGG  
CATTCTCAACGCAGCCAGCCCCAGAAAGTAGTGACCGGCCTCCTCGGATTACTCCGGTTTGGCTCCT  
CCCTTGCTCCCCCTCCTCCACCTCCAGATTTGCATAAAAAAGGCCAAGAAAACCTCTGGCTGGGCCCC  
AGCCTCT**GCTCACTCTGCTCCCCGGGTCTCGG**-3'

B

cDNA detected	Nucleotide sequence	Fragment length
sFRP2-TRE	F, 5'-ctggcaccttacaatccactt R, 5'-tggtcacccatcctggtc	104
sFRP2-1Kb	F, 5'-gaaggctactgccctgctc R, 5'-gctcaagetccatcttctct	132
sFRP2-3Kb	F, 5'-ggggctcaactctttcagtc R, 5'-gtaccttctgtgccactgtc	109
p36B4	F, 5'-taaaagatgtccgctctcctg R, 5'-tccttcagctcttctttgctc	110

Oligonucleotides used for PCR study after ChIP assay

**Figure S3.** Study of the sFRP2 gene promoter by ChIP in vivo. A) Fragment of the sFRP2 promoter. In red are highlighted the two canonical half-sites organized in a DR8 structure. In blue are illustrated the height nucleotides spacing the half-sites. Starting of the exon 1 is in pink. The underlined sequences correspond to the oligonucleotides used for PCR analysis to amplify the sFRP2-TRE fragment. B) Oligonucleotides used for the PCR analysis after ChIP.



**Figure S4.** Fractionation of the epithelial cells along the villus-crypt axis. A) Scheme representing the different fractions recovered. B,C) RT-QPCR analysis of I-Fabp (B) and c-Myc(C) mRNAs. 36B4 mRNA was used as internal control. The picture is representative of two independent experiments. This analysis verified the enrichment by villus-associated or crypt-associated cells in the different fractions. The marker for differentiated enterocytes, I-Fabp, is mainly expressed by fraction 1. The marker for proliferating progenitors in crypt, c-Myc, is mainly expressed by fraction 4. D) Oligonucleotides used for the QPCR analysis by the simplex method.

### III.Troisième article :

## The overexpression of the Thyroid hormone Receptor TR $\alpha$ 1 in the mouse intestinal epithelium is associated with hyperplasia and abnormal epithelial architecture

Elsa Kress<sup>a</sup>, Julien Nadjar<sup>a</sup>, Nicolas Gadot<sup>1</sup>, Ricardo Fodde<sup>2</sup>, Jean-Yves Scoazec<sup>3</sup>, Jacques Samarut<sup>a</sup> and Michelina Plateroti<sup>a\*</sup>.

a) Université de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, Ecole Normale Supérieure de Lyon, INRA, CNRS, Institut de Génomique Fonctionnelle de Lyon, Lyon, France. 1), ANIPATH, Lyon, France. 2) Department of Pathology, Erasmus Medical Center, Rotterdam, The Netherlands. 3) INSERM U 865, Lyon, France.

**En préparation**

### Abstract

**Background & aims:** Thyroid hormones, T<sub>3</sub> and T<sub>4</sub>, are known regulators of the mouse intestinal development at weaning, via a positive control of the epithelial cell proliferation. Thyroid hormones act through nuclear receptors, the TRs, which are T<sub>3</sub>-dependent transcription factors. We have previously shown that the TR $\alpha$ 1 is the T<sub>3</sub> receptor involved in the control of epithelial cell proliferation. It enhances directly the transcription of the  $\beta$ -catenin gene in presence of T<sub>3</sub>, and indirectly the expression of the  $\beta$ -catenin target genes cyclins D1 and D2 as well as c-Myc. It is worth noting that the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway is a major actor of the normal and pathological proliferation of the intestinal epithelial cells. For this reason we address in this paper the question of the tumor inducer potentiality of TR $\alpha$ 1.

**Methods:** We generated transgenic mice that express mouse TR $\alpha$ 1 cDNA under the control of the murine *villin* promoter in epithelial intestinal cells. This leads to the up-regulation of the TR $\alpha$ 1 expression all along the crypt-villus axis.

**Results and conclusion:** The Vill-TR $\alpha$ 1 mice display hyperplastic and ectopic crypts and are more susceptible to develop polyps and adenoma, but not carcinoma. These defects are

reminiscent of the juvenile polyposis as described in Peutz-Jeghers human pathology. We conclude that alteration of the TR $\alpha$ 1 levels disturbs the homeostasis of the intestinal epithelium but is not sufficient per se to trigger carcinogenesis.

Le récepteur nucléaire aux hormones thyroïdiennes TR $\alpha$ 1 contrôle la prolifération des cellules épithéliales de l'intestin chez la souris, lors du développement et à l'âge adulte (Plateroti et al. 1999; Plateroti et al. 2001; Plateroti et al. 2006). Ce contrôle se fait entre autre grâce à la régulation directe de l'expression de la  $\beta$ -caténine (Plateroti et al. 2006). De plus, nous avons montré récemment que TR $\alpha$ 1 contrôle également l'expression de *sFRP2*. Par un mécanisme moléculaire encore inconnu, sFRP2 active la translocation nucléaire de  $\beta$ -caténine et permet l'expression des gènes cibles activateurs du cycle cellulaire (manuscrit soumis). Par ailleurs, les hormones thyroïdiennes sont impliquées dans d'autres voies de signalisation importantes pour la physiologie des cellules épithéliales, comme BMP, Hedgehog ou encore Notch (manuscrit soumis). L'ensemble de ces données indiquent un rôle majeur de la voie des HT dans le contrôle de l'homéostasie de l'épithélium intestinal. La capacité d'activer la prolifération des cellules épithéliales de TR $\alpha$ 1 suggère que ce récepteur peut avoir un rôle d'inducteur de tumorigénèse.

Afin d'explorer cette hypothèse, nous avons élaboré une stratégie de transgénèse visant à surexprimer TR $\alpha$ 1 dans l'épithélium intestinal. Pour cela, nous avons utilisé les séquences régulatrices du gène de la *Villine* (Pinto et al. 1999), déjà caractérisées comme étant spécifiques d'une expression dans l'épithélium intestinal. L'analyse du phénotype des souris transgéniques Vill-TR $\alpha$ 1 n'est pas encore terminée à ce jour. Les premières conclusions et les perspectives expérimentales à cours terme sont également présentées.

Nous avons dans un premier temps caractérisé l'expression du transgène dans trois des huit lignées fondatrices obtenues après injection dans des ovocytes fécondés. Le transcript du transgène Vill-TR $\alpha$ 1 est exprimé dans l'intestin grêle des trois fondateurs, ainsi que dans le colon, mais pas dans d'autres organes (cœur, poumon, foie, rein, estomac). La protéine TR $\alpha$ 1 est bien surexprimée dans l'intestin grêle des fondateurs, comparée aux animaux WT ; elle est

également exprimée dans les noyaux de toutes les cellules épithéliales chez les animaux transgéniques.

Lorsque nous avons observé des coupes H&E d'intestins de souris Vill-TR $\alpha$ 1 âgées d'un mois, nous remarquons plusieurs faits frappants. En effet, si l'épithélium de certaines zones des coupes semble normal, d'autres présentent un compartiment prolifératif de taille accrue, des villosités plus courtes et plus larges que la normale. L'observation du tapis de villosités en MEB révèle la présence de villosités orientées selon un axe aberrant, ou fusionnées à la base.

Ces malformations de l'architecture de l'épithélium intestinal nous ont amenés à analyser la prolifération et la différenciation des cellules épithéliales chez les souris Vill-TR $\alpha$ 1. Nous avons pu constater que le compartiment prolifératif des cryptes intestinales est plus étendu chez les souris transgéniques comparées aux WT, y compris dans les zones où l'épithélium a un aspect normal. La différenciation des différents cytotypes n'est pas affectée. Le phénotype observé est donc uniquement dû à la prolifération accrue.

De façon régulière, nous observons sur les coupes d'intestins de souris Vill-TR $\alpha$ 1 des lésions plus développées qu'une simple malformation des villosités. Il s'agit de villosités ramifiées, émergeant de cryptes ectopiques fortement prolifératives. Ce phénotype rappelle celui des souris mutantes pour la voie BMP (Haramis et al. 2004; He et al. 2004; He et al. 2007). Nous avons également pu remarquer la présence de lésions de type adénomes, comparables à celles que l'on retrouve chez les souris mutantes pour le gène APC.

Toutes ces données indiquent que la surexpression de TR $\alpha$ 1 induit l'hyperprolifération de l'épithélium intestinal et crée un terrain favorable à l'apparition de mutations déclenchant des adénomes.

Au vu du phénotype des souris Vill-TR $\alpha$ 1, nous pouvons avancer l'hypothèse que l'altération de l'expression de TR $\alpha$ 1 est un événement très précoce dans le schéma d'initiation de la tumorigénèse. La prolifération trop rapide des progéniteurs épithéliaux favoriserait alors



l'instabilité génomique et l'apparition de mutations dans la voie Wnt/ $\beta$ -caténine, selon la séquence présentée dans l'introduction. Nous allons tester cette hypothèse en croisant les souris Vill-TR $\alpha$ 1 avec les souris APC<sup>1638N+/-</sup>, afin de voir si l'apparition de lésions de type adénocarcinomes et carcinome est accéléré chez les doubles mutants. Par ailleurs, nous allons tester le potentiel tumorigénique des cellules épithéliales surexprimant TR $\alpha$ 1 en les injectant sous la peau de souris Nude. Afin d'intégrer les données obtenus lors de l'analyse transcriptomique, nous analyserons l'expression de certains gènes cibles des HT, notamment de ceux appartenant aux voies Wnt, BMP et Notch.

Grâce au modèle des souris Vill-TR $\alpha$ 1, nous avons pu montrer que TR $\alpha$ 1 a bien un rôle inducteur de tumeurs lorsque son expression est dérégulée. Les conséquences de cette conclusion en terme de médecine humaine seront discutées dans la partie Discussion et Perspectives de ma thèse.

# **The overexpression of the Thyroid hormone Receptor TR $\alpha$ 1 in the mouse intestinal epithelium is associated with hyperplasia and abnormal epithelial architecture**

Elsa Kress<sup>a</sup>, Julien Nadjar<sup>a</sup>, Nicolas Gadot<sup>1</sup>, Ricardo Fodde<sup>2</sup>, Jean-Yves Scoazec<sup>3</sup>, Jacques Samarut<sup>a</sup> and Michelina Plateroti<sup>a\*</sup>.

a) Université de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, Ecole Normale Supérieure de Lyon, INRA, CNRS, Institut de Génomique Fonctionnelle de Lyon, Lyon, France. 1), ANIPATH, Lyon, France. 2) Department of Pathology, Erasmus Medical Center, Rotterdam, The Netherlands. 3) INSERM U 865, Lyon, France.

\*: Corresponding Author.

Mailing address: Institut de Génomique Fonctionnelle de Lyon, Ecole Normale Supérieure de Lyon, 46 allée d'Italie, 69364 Lyon Cedex 07, France.

Tel: 33 472728536

Fax: 33 472728080

E-mail: [Michela.Plateroti@ens-lyon.fr](mailto:Michela.Plateroti@ens-lyon.fr)

## **Abstract**

**Background & aims:** Thyroid hormones, T<sub>3</sub> and T<sub>4</sub>, are known regulators of the mouse intestinal development at weaning, via a positive control of the epithelial cell proliferation. Thyroid hormones act through nuclear receptors, the TRs, which are T<sub>3</sub>-dependent transcription factors. We have previously shown that the TR $\alpha$ 1 is the T<sub>3</sub> receptor involved in the control of epithelial cell proliferation. It enhances directly the transcription of the  $\beta$ -catenin gene in presence of T<sub>3</sub>, and indirectly the expression of the  $\beta$ -catenin target genes cyclins D1 and D2 as well as c-Myc. Due to the key role of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in the control of the normal and pathological proliferation of the intestinal epithelial cells, we address in this paper the question of the tumor inducer potentiality of TR $\alpha$ 1.

**Methods:** We generated transgenic mice that express mouse TR $\alpha$ 1 cDNA under the control of the murine *villin* promoter in epithelial intestinal cells. This leads to the up-regulation of the TR $\alpha$ 1 expression all along the crypt-villus axis.

**Results and conclusion:** The Vill-TR $\alpha$ 1 mice display hyperplasic and ectopic crypts and are more susceptible to develop polyps and adenoma, but not carcinoma. These defects are reminiscent of the juvenile polyposis as described in Peutz-Jeghers human pathology. We conclude that the alteration of the TR $\alpha$ 1 levels disturbs the homeostasis of the intestinal epithelium but is not sufficient per se to trigger carcinogenesis.

## Introduction

The mammalian intestine is an organ constituted of an epithelium of endodermal origin and of connective and smooth muscle tissues derived from the splanchnic mesoderm <sup>1</sup>. The mature intestinal epithelium is spatially organized in a proliferative, the crypts of Lieberkühn, and a differentiated, the finger-shaped villi, compartments <sup>2</sup>. Four differentiated cytotypes characterize this epithelium. They are the enterocytes (with absorptive function), the enteroendocrine cells (producing digestive enzymes), the goblet cells (secreting the protective mucus) and the Paneth cells (producing anti-microbial peptides) <sup>3</sup>. The Paneth cells are the only differentiated cell type present in the crypts. These four cellular lineages originate from the multipotent stem cells located in the crypts <sup>4</sup>. Moreover, the presence of these stem cells allows the perpetual cell renewal of the intestinal epithelium. In the mouse the complete epithelial tissue renewal lasts 3 days <sup>5</sup>. The crypts are then the compartment of stem cells division, of quick proliferation and commitment of the epithelial progenitors into a differentiation fate <sup>6</sup>. To ensure the homeostasis of this highly organized tissue, the physiology of the crypt compartment must be tightly regulated.

Several pathways are involved in the regulation of the crypt cell homeostasis. The Notch pathway controls the cell fate determination <sup>7</sup>, the molecular partners of the Hedgehog pathway are involved in the dialogue between the epithelium and the connective tissue <sup>8</sup>. The BMP pathway delimits the crypts location and the stem cell number <sup>9, 10</sup>. The Wnt/ $\beta$ -catenin pathway is involved in the normal and pathological proliferation of the epithelial cells <sup>11, 12</sup>.

The thyroid hormone (TH) signaling is mediated by T<sub>3</sub> binding to nuclear receptors, the TRs <sup>13</sup>. These hormone-dependent transcription factors are encoded by two genes TR $\alpha$  and TR $\beta$ , each encoding several protein isoforms <sup>13</sup>. By analyzing several TR knockout mice, we were able to show that TH and TR control the mouse intestinal post-natal development at weaning. More precisely, we showed that the TR $\alpha$ 1 receptor controls the proliferation of the epithelial

progenitor cells <sup>14, 15</sup>. More recently, we focused on the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway, for its well known implication in the regulation of the epithelial progenitor cell proliferation <sup>16</sup>. We have shown that the expression of the intracellular effector of the Wnt signaling, the  $\beta$ -catenin, is regulated by the TH-TR $\alpha$ 1, in an epithelial cell-autonomous way. Moreover, the increased expression of  $\beta$ -catenin leads to an increased expression of its molecular targets and the subsequent enhancement of the crypt cell proliferation <sup>17</sup>.

These data open a new perspective in considering the TR $\alpha$ 1 receptor as a potential tumor-inducer. To address this question, we describe here the generation of a new transgenic mouse model that expresses the mouse TR $\alpha$ 1 cDNA under the control of the murine *villin* promoter <sup>18</sup> in epithelial cells of large and small intestine.

## **Materials and methods**

### **Transgenesis and animal breeding**

The mouse TR $\alpha$ 1 cDNA followed by SV40 polyadenylation signal has been amplified from a TR $\alpha$ 1 expression vector, using primers creating a Not1 restriction site in 5' and a Not1 and Xho1 restriction sites in 3'. The PCR fragment was then cloned into a pGEMT-easy vector (Promega) and amplified in DH5 $\alpha$  bacteria (Invitrogen). Its sequence has been verified by DNA sequencing. The Not1 digested fragment was then inserted into the pVill-AatII<sup>19</sup> and transfected into XL-10 gold competent bacteria (Stratagene). The transgene has been excised by Xho1 digestion and purified with the QIAex II extraction kit (Qiagen). The microinjection has been realized at the Plateau de Biologie Expérimentale de la Souris, Ecole Normale Supérieure de Lyon (Lyon, France). The transgenesis protocol has been approved by the Committee of the Ecole Normale Supérieure de Lyon.

The mice were housed and maintained with approval from the animal experimental committee of the Ecole Normale Supérieure de Lyon (Lyon, France), and in accordance with European legislation on animal care and experimentation. We have obtained 8 founders. The transgenic lines have been backcrossed in the C57BL6 genetic background. For experiments we used transgenic and wild type animals issued from the same litters, in order to avoid the artifacts due to different genetic backgrounds.

APC<sup>1638N/+</sup> mice were from Professor R. Fodde laboratory<sup>20</sup>.

### **Genotyping**

For the genotyping we used a nested PCR approach. The first PCR used the following primers:

PCR1 Forward: 5' AATTCGGATCCATGGAACAG

PCR1 Reverse: 5' TGCAGCCCTCACAAGTGATA

We run this PCR for 40 cycles. 2  $\mu$ L ml of the product of the first PCR was used as template for the second PCR, by using the following primers:

PCR2 Forward: 5' CAGAAGCCAAGCAAGGTGGA

PCR2 Reverse: 5' TTGTCCCCACACACGACACA

The PCR product length is 174 bp.

### **Histological analysis**

Animals were sacrificed at the indicated age and the intestine was quickly removed. The proximal and the distal part of the small intestine as well as the colon were fixed in 4% of paraformaldehyde (PFA) for the histology and the immunohistochemistry, or frozen in liquid nitrogen and used for RNA and/or protein extraction. For the macroscopic observations, around 3 cm of mucosa corresponding to different proximo-distal part of the small intestine and colon, were washed with PBS and opened lengthwise. By observation under a binocular microscope (Olympus), we recovered abnormal and normal shaped portions of the mucosa and fixed them in 4% PFA for histology and immunohistochemical studies.

### **Scanning electron microscopy**

Fragments of intestinal mucosa, selected under the binocular microscope, were fixed for 1 hour in cacodylate buffer (0.1 M cacodylate, pH 6.9, 10 mM  $MgCl_2$ , 10 mM  $CaCl_2$ , 90 mM sucrose) containing 3 % glutaraldehyde and 5 % formaldehyde, dehydrated in increasing concentrations of acetone and dried with liquid  $CO_2$ . We observed the samples with a Hitachi 5800 apparatus.

### **RNA extraction and analysis**

Intestine samples were lysed using the Precellys24 (Bertin). RNA were extracted by using the QIAGEN RNeasy kit (Qiagen). To avoid the presence of contaminating DNA, DNase digestion (Qiagen) was performed in all preparations. Reverse transcription was performed using MuMLV reverse transcriptase (Promega) on 1 µg of total RNA according to the manufacturer's instructions, using random hexanucleotide primers (Invitrogen) or a reverse primer specific of the SV40 polyA: 5'-GCTGCAATAAACAAGTTCTGCTT. PCR analysis has been performed to amplify TRα1 cDNA, by using Euroblue Taq (Eurobio), and a BioRad thermocycler. We used the following primers: Forward: 5'-TCGACTTTCATGTGGAGGAAG, and Reverse: 5'-TGCCTTTAACCTGGATGACAC. The fragment length is 231 bp.

### **Immunostaining**

Paraffin sections (5 µm thickness) were used for indirect immunostaining. Briefly, sections were deparaffined in methylcyclohexane for 10 minutes, hydrated in ethanol, and washed with PBS. Slides were then subjected to antigen retrieval, using microwave heating in 0.01M citrate buffer pH 6, and incubated for one hour at room temperature with blocking buffer (10% normal goat serum, 1% BSA and 0.02 Triton-X 100 in PBS). The slides were incubated with primary antibodies over-night at 4°C followed by incubation with fluorescent anti-mouse or anti-rabbit antibodies (Jackson Laboratories). All nuclei were stained with Hoechst (Sigma). Fluorescence and bright-field microscopy was performed on a Zeiss Axioplan microscope.

### **Western blot**



Whole-protein extracts were obtained by homogenizing mouse small intestine in RIPA buffer (Tris pH 7.4 50mM, NaCl 150mM, PMSF 1mM, EDTA 1mM, Aprotinin 5µg/mL, Leupeptine 5µg/mL, Triton X-100 1%, Sodium deoxyolate 1%, SDS 0,1%, Protease Inhibitors 40 µL/mL).

Proteins (100 µg per lane) were separated on 8 % acrylamide-bis acrylamide (29:1) gel and transferred to a nitrocellulose membrane (Hybond ECL) before saturation and incubation with the first antibody. This was followed by incubation with secondary anti-rabbit or anti-mouse IgG-horseradish peroxidase (Promega). The signal was analyzed using the enzymatic chemiluminescence detection kit (LumiLight, Roche).

### **Antibodies**

For the immunolabeling on sections or WBs, we used the following antibodies: anti-TRα1 (Plateroti et al., 2006) (dilution WB 1:250; IF 1/50); anti-Ki67 (Labvision, dilution 1:200); anti-β-catenin (Santa Cruz, dilution 1:40); anti-iFABP (gift from Pr JI Gordon, Washington University St Louis, USA. Dilution 1:1000); anti-Chromogranin3 (Zymed, dilution 1:50).

## Results and Conclusions

### Generation and characterization of the Vill-TR $\alpha$ 1 transgenic mice

A 9-kb regulatory region of the mouse *Villin* gene<sup>18, 19</sup> was used to drive the expression of the mouse TR $\alpha$ 1 cDNA in the epithelium of the small intestine and the colon (see scheme Figure 1A). By microinjection of the linear transgene in fertilized oocytes of FVBxBDd2 mice, we have obtained 8 founders. We have worked mainly with three of them: F42, F43 and F50. First of all we have controlled that the expression of the endogenous TR $\alpha$ 1 wasn't affected, nor were the levels of circulating T<sub>3</sub> and T<sub>4</sub> hormones (not shown). To verify the intestine epithelium-specific over-expression of the transgenic TR $\alpha$ 1 we have dissected the intestines and several organs to perform RT-PCR analysis. In order to amplify only the transgenic TR $\alpha$ 1 cDNA, we reverse-transcribed the RNA by using a reverse primer specific to the transgene (arrow in the figure 1A). Then we have amplified the cDNA by PCR using primers internal to the TR $\alpha$ 1 mRNA sequence. Figure 1B shows that a band of the expected size was present in the small intestine of the three founders, but not in the wild types. Moreover, the transgene is expressed in the colon, but not in the stomach, liver, lung, kidney and heart, validating the specificity of its expression. We have also performed western blot analysis of TR $\alpha$ 1 expression in whole protein extracts of small intestine (Figure 1C). The Vill-TR $\alpha$ 1 mice display a clear-cut increase in the TR $\alpha$ 1 protein expression compared to the WT animals. We then verified the distribution of the TR $\alpha$ 1 protein along the crypt/villus axis by immunohistochemical analysis. Whereas in the WT epithelium TR $\alpha$ 1 was mainly expressed in the nucleus of crypt cells (Figure 1D), in the transgenic mice TR $\alpha$ 1 was present in nuclei of both crypt and villus cells (Figure 1E). The distribution of the TR $\alpha$ 1 protein was the same in all the other founders analyzed (data not shown). As the expression levels of the transgene in the three founders were similar, for in deep analysis we focused on the F42 transgenic line.

First of all we characterized the growth profile of the transgenic animals compared to the WT litters (Figure 1F). The growth curve of the WT and most of the Vill-TR $\alpha$ 1 mice was very similar (compare blue and red curves). However, we noted that two transgenic animals were greatly and significantly smaller than the other mice (orange curve). The histological analysis of the intestine of those two mice revealed a very thin and greatly reduced villus height (data not shown). It is worth pointing that this severe phenotype appears rarely.

In conclusion, we succeeded to generate a mouse model to study the effects of the overexpression of TR $\alpha$ 1 in the intestinal epithelium.

### **The Vill-TR $\alpha$ 1 transgenic mice display abnormalities in the epithelial architecture**

We have analyzed the intestinal morphology of the small intestine of Vill-TR $\alpha$ 1 animals on Haematoxylin & Eosin stained paraffin sections. The portions of the mucosa analyzed were randomly selected during the sampling. One month-old WT littermates presented a typical intestinal epithelium organized in finger-shaped villi and crypt compartments (Figure 2 A, B). The Vill-TR $\alpha$ 1 mice displayed several abnormalities in the epithelium. Sometimes we observed that the crypt compartment was extended (Figure 2 C, D), or that the villi were shorter and larger as compared with the normal villi shape (Figure 2 E, F). However, together with altered portions of the intestine we have also observed parts histologically similar to the WT. The distribution of the abnormal structures was equal in the different regions of the small intestine ad colon (not shown) and was also highly frequent. In fact, we were able to observe such structures in every histological section that we have analyzed.

Intestinal mucosa whole mounting from three-month transgenic mice has been observed under the binocular microscope. Some portions of the mucosa clearly displayed irregular groups of villi protruding into the lumen (Figure 2G). Normal and abnormal parts of the intestine were removed from the transgenic animals and used for scanning electron

microscopy. The parts considered as normal presented regular and well structured villi (Figure 2H). The abnormal samples clearly displayed misshaped villi growing in wrong-oriented axis (Figure 2I, red arrow), or clearly forming branched structures (Figure 2J, red dots). It is worth noting that a large number of villi are thicker than those of the normal parts. These data clearly indicate that the Vill-TR $\alpha$ 1 transgenic animals suffer for disturbed crypt-villus architecture.

### **The epithelium of Vill-TR $\alpha$ 1 mice is hyperproliferative**

We have previously described that TR $\alpha$ 1 is a key regulator of the proliferation of the epithelial crypt cells <sup>17</sup>. Histological and morphological analyses have shown that the Vill-TR $\alpha$ 1 mice have extended crypts and crypt-like structures. We have then analyzed the proliferating cells in the intestine of the transgenic mice compared to the non-transgenic litters. Ki67 immunolabeling, leading to visualize proliferating cells, showed that the thickness of the crypt compartment of a “normal” part of the Vill-TR $\alpha$ 1 small intestine is increased as compared to the WT mice (Figure 3A and B, compare the space between the two curves). We have also analyzed some markers which characterize the differentiated epithelial cytotypes. The differentiation of enterocytes (Figure 3 C, D) and of the secretory cells (data not shown) was not affected.

These data indicate that the abnormal cell proliferation, observed in the crypts of the Vill-TR $\alpha$ 1 mice, has no consequences on the epithelial cell differentiation.

With a sporadic frequency, we could also observe some more developed abnormalities, such as that reported in the figure 3 E, F. By histological approach and immunolocalization, we could observe the presence of polyp-like structures with branched villi. Some misshaped villi also grow from ectopic crypts. These features remind to the Apc mutant mice <sup>20</sup> or to mice

PTEN-deficient <sup>10</sup> as well as to mice harboring mutations in the BMP/TGF $\beta$  pathway <sup>9, 21</sup>. Finally, with a frequency of 1 out 8 mice in a random screening we have observed that the hyperplastic crypts degenerate into adenoma (Figure 3 G, H), clearly resembling to the adenoma structures observed in the APC<sup>1638N/+</sup> mice (Figure 3 I, J) <sup>20</sup>. We did not found any adenoma or polyp-like structure in any of the WT littermates analyzed.

From these results we can conclude that the Vill-TR $\alpha$ 1 mice suffer for intestinal hyperplasia resembling to Peutz-Jeghers juvenile polyposis in humans. Finally, these mice are more sensitive to develop polyps and eventually adenoma.

## Discussion and Perspectives

In previous reports from our laboratory, we pointed out the key role of thyroid hormone activated TR $\alpha$ 1 nuclear receptor in the control of the proliferation of the intestinal epithelial cells<sup>15, 17</sup>. TR $\alpha$ 1 and T<sub>3</sub> regulate the proliferation of crypt cells by enhancing the transcription of the  $\beta$ -catenin, and subsequently of its target genes. Abnormal activation of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway is involved in intestinal tumorigenesis. The aim of developing the transgenic model we present here was to better understand the implication of TR $\alpha$ 1 in the regulation of normal and pathological proliferation.

We used the villin promoter to express the mouse TR $\alpha$ 1 cDNA in the epithelium of the small intestine and the colon. The TR $\alpha$ 1 protein is expressed in the whole epithelium of the transgenic mice whereas it is expressed only in the crypt cells in WT mice. The histological analysis of the small intestine reveals several abnormalities in the architecture, the most striking is the over-developed crypt compartment. In the normal parts of the transgenic intestine, the proliferative compartment is more extended compared to WT, but the differentiation of the epithelial cytotypes is not disturbed. We frequently observed polyp-like structures and sometimes adenoma in the intestine of transgenic mice but never in WT. We concluded from this study that the TR $\alpha$ 1 overexpression induces the crypt hyperplasia, but can also favor the apparition of neoplasia. In the sequence of malignant transformation, mutational events leading to enhanced expression of TR $\alpha$ 1 could be then a very early step. This in turn, promotes the increase of crypt cell proliferation rate as well as the statistical risk of the occurrence of a second mutational event initiating the neoplasia. To test this hypothesis, we are currently crossing the Vill-TR $\alpha$ 1 mice with the APC<sup>1638N/+</sup> mice. When we will have a significant cohort, we will count the number and type of the lesions in the simple and double mutants. We have also planned to analyze the levels of  $\beta$ -catenin (mRNA and protein) in the Vill-TR $\alpha$ 1 mice epithelium, in order to determine whether its expression is disturbed.

Preliminary immunostaining results (not shown) indicate that there is an increased number and level of nuclear staining of  $\beta$ -catenin in the crypt cells of transgenic mice compared to WT mice.

In order to test the tumorigenic potential of the Vill-TR $\alpha$ 1 epithelial cells, we have planned to perform a subcutaneous injection into Nude mice. We will prepare isolated epithelial cells from WT or Vill-TR $\alpha$ 1 mice, and follow the eventual growth of abnormal structures in Nude mice. From this experiment we will determine the potentiality of TR $\alpha$ 1 to trigger subcutaneous tumors in an immunosuppressed context.

Our recent comparative transcription profile analysis of thyroid hormone target genes revealed that the expression of several partners of the Wnt/ $\beta$ -catenin and BMP/TGF $\beta$  pathways is regulated by thyroid hormones. We showed that sFRP2, mainly considered as an inhibitor of the canonical Wnt pathway<sup>22</sup>, is an activator of  $\beta$ -catenin in the intestinal epithelial cells. In order to understand the molecular mechanisms of cell transformation/tumorigenesis induced by TR $\alpha$ 1, we will analyze by QPCR the expression levels of the characterized target genes in the Vill-TR $\alpha$ 1 mice, and more specifically in the altered structures of the epithelium.

These results on the role of TR $\alpha$ 1 and TH in the initiation of intestinal tumorigenesis could be of great interest in the field of cancer medicine. It could be used as a diagnosis/prognosis marker in molecular pathology, or as a target for specific drugs.

### **Acknowledgment**

We gratefully acknowledge Nadine Aguilera for animal handling. We thank Denise Aubert and Christelle Morin from the ANIGENE platform. We thank Simone Peyrol, Faculty of Medicine Laënnec for the SEM experiment. We are indebted to Dr Sylvie Robine for providing us the pVill-9 kb promoter. This work was supported by the Agence Nationale

pour la Recherche (grant ANR-06-BLAN-0232-01) and the program Equipe Labellisée of the Ligue Nationale contre le Cancer. EK studentship is supported by the Ligue Nationale contre le Cancer. MP is supported by INSERM.



## **Bibliography**

1. Rubin DC. Intestinal morphogenesis. *Curr Opin Gastroenterol* 2007;23:111-4.
2. Crosnier C, Stamatakis D, Lewis J. Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control. *Nat Rev Genet* 2006;7:349-59.
3. Karam SM. Lineage commitment and maturation of epithelial cells in the gut. *Front Biosci* 1999;4:D286-98.
4. Barker N, van Es JH, Kuipers J, Kujala P, van den Born M, Cozijnsen M, Haegebarth A, Korving J, Begthel H, Peters PJ, Clevers H. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *Lgr5*. *Nature* 2007.
5. Stappenbeck TS, Wong MH, Saam JR, Mysorekar IU, Gordon JI. Notes from some crypt watchers: regulation of renewal in the mouse intestinal epithelium. *Curr Opin Cell Biol* 1998;10:702-9.
6. Brittan M, Wright NA. Gastrointestinal stem cells. *J Pathol* 2002;197:492-509.
7. Nakamura T, Tsuchiya K, Watanabe M. Crosstalk between Wnt and Notch signaling in intestinal epithelial cell fate decision. *J Gastroenterol* 2007;42:705-10.
8. van den Brink GR. Hedgehog signaling in development and homeostasis of the gastrointestinal tract. *Physiol Rev* 2007;87:1343-75.
9. He XC, Zhang J, Tong WG, Tawfik O, Ross J, Scoville DH, Tian Q, Zeng X, He X, Wiedemann LM, Mishina Y, Li L. BMP signaling inhibits intestinal stem cell self-renewal through suppression of Wnt-beta-catenin signaling. *Nat Genet* 2004;36:1117-21.
10. He XC, Yin T, Grindley JC, Tian Q, Sato T, Tao WA, Dirisina R, Porter-Westpfahl KS, Hembree M, Johnson T, Wiedemann LM, Barrett TA, Hood L, Wu H, Li L. PTEN-deficient intestinal stem cells initiate intestinal polyposis. *Nat Genet* 2007;39:189-98.

11. Fodde R, Brabletz T. Wnt/beta-catenin signaling in cancer stemness and malignant behavior. *Curr Opin Cell Biol* 2007;19:150-8.
12. Clevers H. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* 2006;127:469-80.
13. Flamant F, Samarut J. Thyroid hormone receptors: lessons from knockout and knock-in mutant mice. *Trends Endocrinol Metab* 2003;14:85-90.
14. Plateroti M, Chassande O, Fraichard A, Gauthier K, Freund JN, Samarut J, Keding M. Involvement of TR $\alpha$ - and beta-receptor subtypes in mediation of T3 functions during postnatal murine intestinal development. *Gastroenterology* 1999;116:1367-78.
15. Plateroti M, Gauthier K, Domon-Dell C, Freund JN, Samarut J, Chassande O. Functional interference between thyroid hormone receptor  $\alpha$  (TR $\alpha$ ) and natural truncated TR $\Delta\alpha$  isoforms in the control of intestine development. *Mol Cell Biol* 2001;21:4761-72.
16. Gregorieff A, Clevers H. Wnt signaling in the intestinal epithelium: from endoderm to cancer. *Genes Dev* 2005;19:877-90.
17. Plateroti M, Kress E, Mori JJ, Samarut J. Thyroid hormone receptor  $\alpha$ 1 directly controls transcription of the beta-catenin gene in intestinal epithelial cells. *Mol Cell Biol* 2006;26:3204-14.
18. el Marjou F, Janssen KP, Chang BH, Li M, Hindie V, Chan L, Louvard D, Chambon P, Metzger D, Robine S. Tissue-specific and inducible Cre-mediated recombination in the gut epithelium. *Genesis* 2004;39:186-93.
19. Pinto D, Robine S, Jaisser F, El Marjou FE, Louvard D. Regulatory sequences of the mouse villin gene that efficiently drive transgenic expression in immature and differentiated epithelial cells of small and large intestines. *J Biol Chem* 1999;274:6476-82.

20. Fodde R, Edelmann W, Yang K, van Leeuwen C, Carlson C, Renault B, Breukel C, Alt E, Lipkin M, Khan PM, et al. A targeted chain-termination mutation in the mouse *Apc* gene results in multiple intestinal tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:8969-73.
21. Haramis AP, Begthel H, van den Born M, van Es J, Jonkheer S, Offerhaus GJ, Clevers H. De novo crypt formation and juvenile polyposis on BMP inhibition in mouse intestine. *Science* 2004;303:1684-6.
22. Kawano Y, Kypta R. Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. *J Cell Sci* 2003;116:2627-34.

## Figures legends

### Figure 1

Generation of the Villin-TR $\alpha$ 1 transgenic mice. A) The 9kb sequence of the villin promoter drives the expression of the mouse TR $\alpha$ 1 cDNA. The arrow represent the position of the primer used form the specific Reverse transcription; B) Expression of the transgenic TR $\alpha$ 1 mRNA in three transgenic lines, in several organs of the GI tract: St=stomach, Li=liver, Lu=lung, Ki=kidney, He=heart, C=colon, SI=small intestine. The organs are from F42. The specific band is highlighted by the red arrow; C) Expression of the TR $\alpha$ 1 protein in the small intestine of transgenic or wild type animals. The positive control is the murine TR $\alpha$ 1 protein overexpressed by transfected Cos-7 cells. The specific band is highlighted by the red arrow, the black arrow shows an aspecific band found in WT intestine; D and E) Immunolabeling of TR $\alpha$ 1 on intestinal paraffin sections from WT (D) or Vill-TR $\alpha$ 1 (E) mice (F42). Pictures show the merging of TR $\alpha$ 1 immunolabeling (red) and nuclear staining (blue). Animals were one month-old. Bars= 15  $\mu$ M; F) Growth curves of transgenic animals (F42), or WT mice. The measurement has been realized on males: 5 WT, 4 Vill-TR $\alpha$ 1, 2 small Vill-TR $\alpha$ 1.

### Figure 2

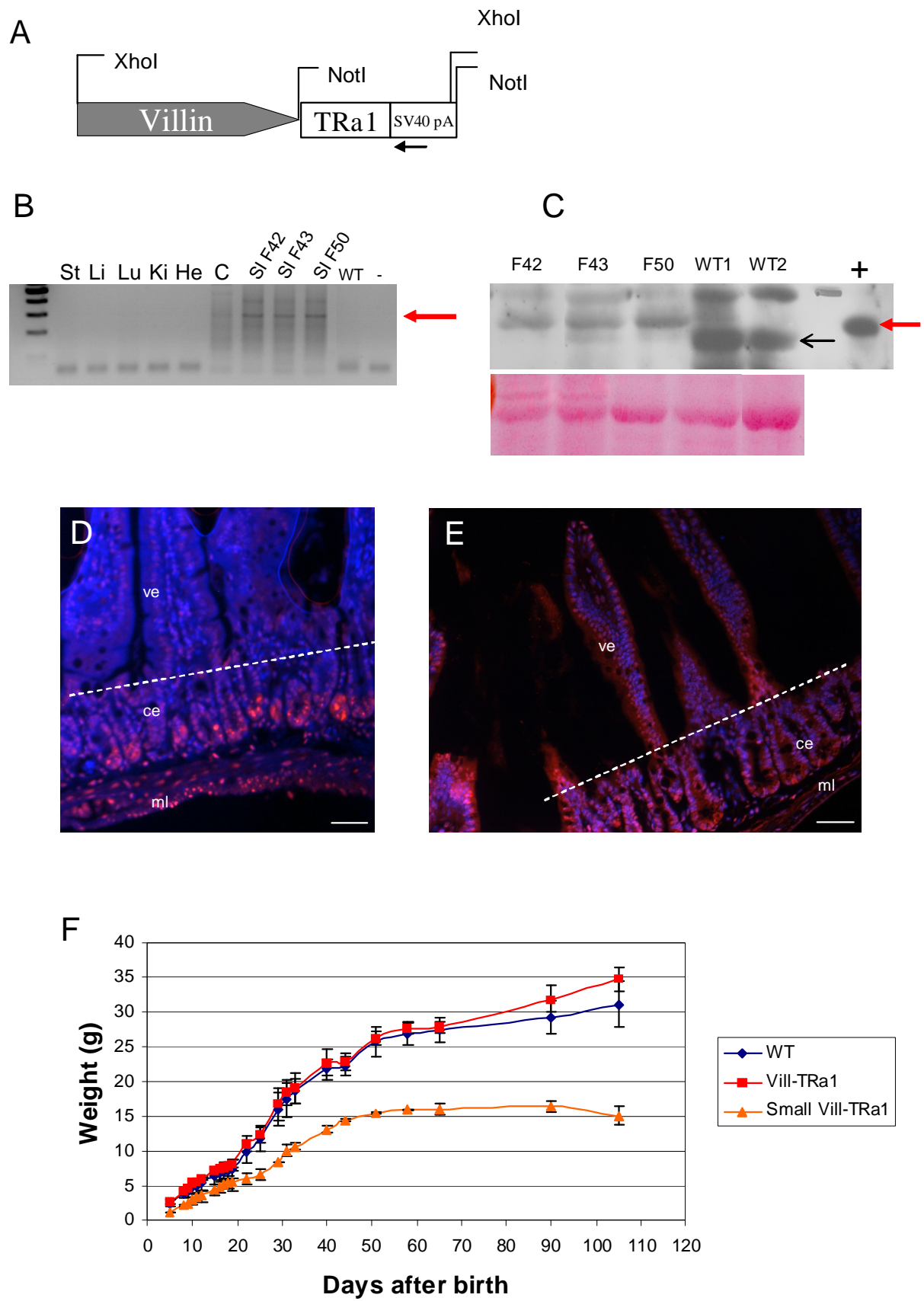
Architectural abnormalities in the intestine of Vill-TR $\alpha$ 1 transgenic mice. A-F) Haematoxylin & Eosin staining of paraffin sections of WT (A,B) or Vill-TR $\alpha$ 1 (C,-F) small intestine. All mice were one month-old. The black dotted bars define the limit between the crypts and the villi. Some crypts in B are highlighted by orange dots. Abbreviations: ve, villus epithelium; ce, crypt epithelium; ct, connective tissue; ml, muscle layers. Bars= 30  $\mu$ M (A,C,E,F) or 15  $\mu$ M (B,D). G) Mucosa appearance as observed under binocular microscope. Note the normal features of the villi (arrow) and the packed villi in the indicated zone. H-J) Scanning Electron

microscopy of the epithelium of Vill-TR $\alpha$ 1 mice (3 months-old). H represent typical picture of normal shaped villi, I and J abnormal villi. Bars= 30  $\mu$ M.

### Figure 3

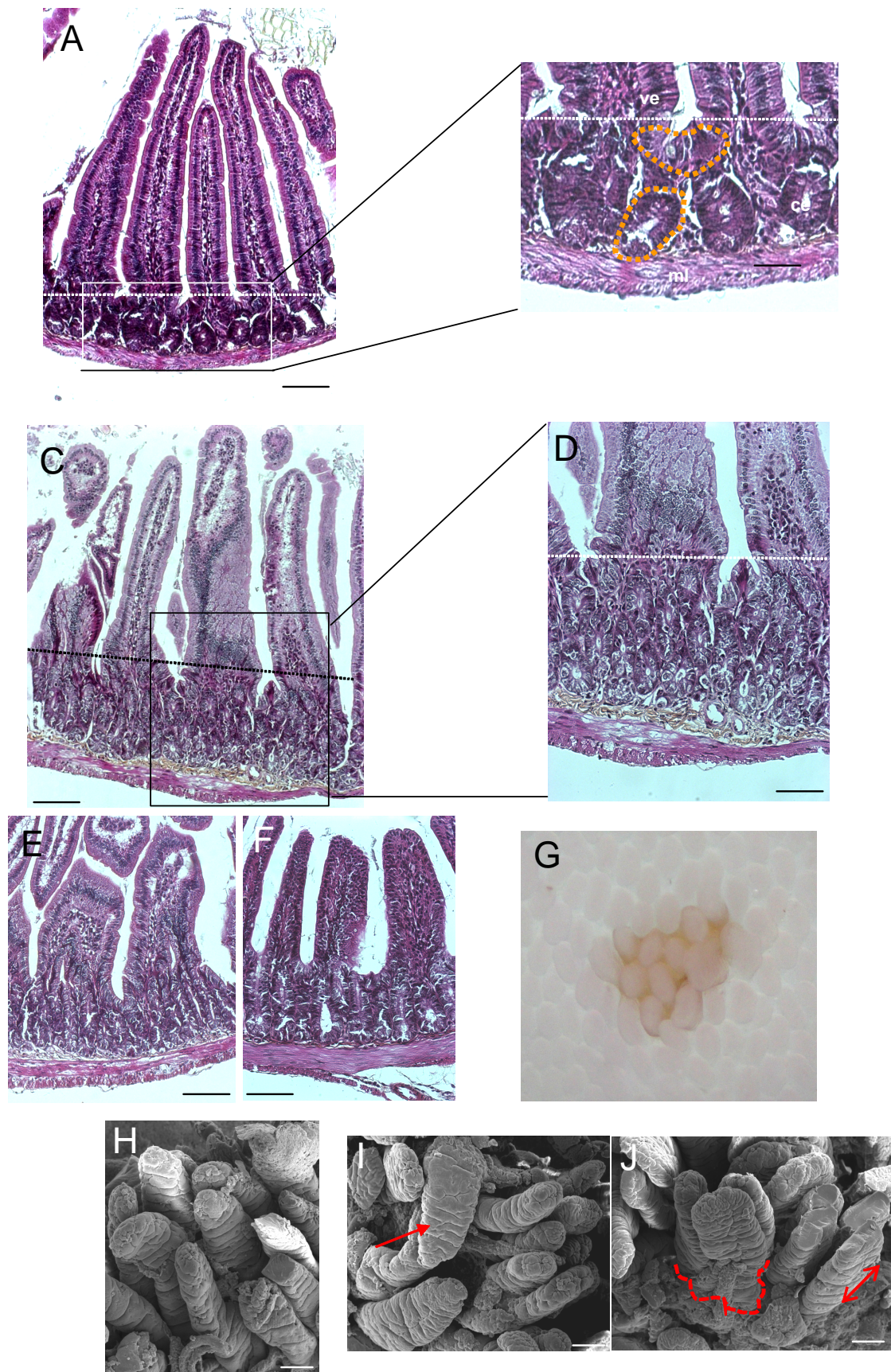
The Vill-TR $\alpha$ 1 epithelium develops hyperplastic crypts. A,B) Immunolabeling of proliferative cells by Ki67 antibody on paraffin sections from WT (A) or Vill-TR $\alpha$ 1 (B) one month-old mice. Pictures show the merging of Ki67 immunolabeling (red) and nuclear staining by Hoechst (blue). The white dotted curves define the limit between the crypts and the villi compartments, and the white curves the lower limit of the epithelium. C,D) Immunolabeling of enterocytes by IFABP antibody on paraffin sections from WT (C) or Vill-TR $\alpha$ 1 (D) one month-old mice. E,F) Branched villus structure, with high Ki67 labelling on crypt-like structures (white arrow on E and F). G,H) Adenomatous structure in the intestine of one month-old Vill-TR $\alpha$ 1 mice. G) shows Haematoxylin & eosin staining. H) displays the merging of Ki67 (red) and Hoechst (blue) staining. I,J) Typical adenoma from APC1638N/+ mice. E, Haematoxylin & eosin staining. F, Ki67 (red) and nuclear (blue) staining. Bars: A- E and G-J =30  $\mu$ M; F=7  $\mu$ M.

**Figure 1:**



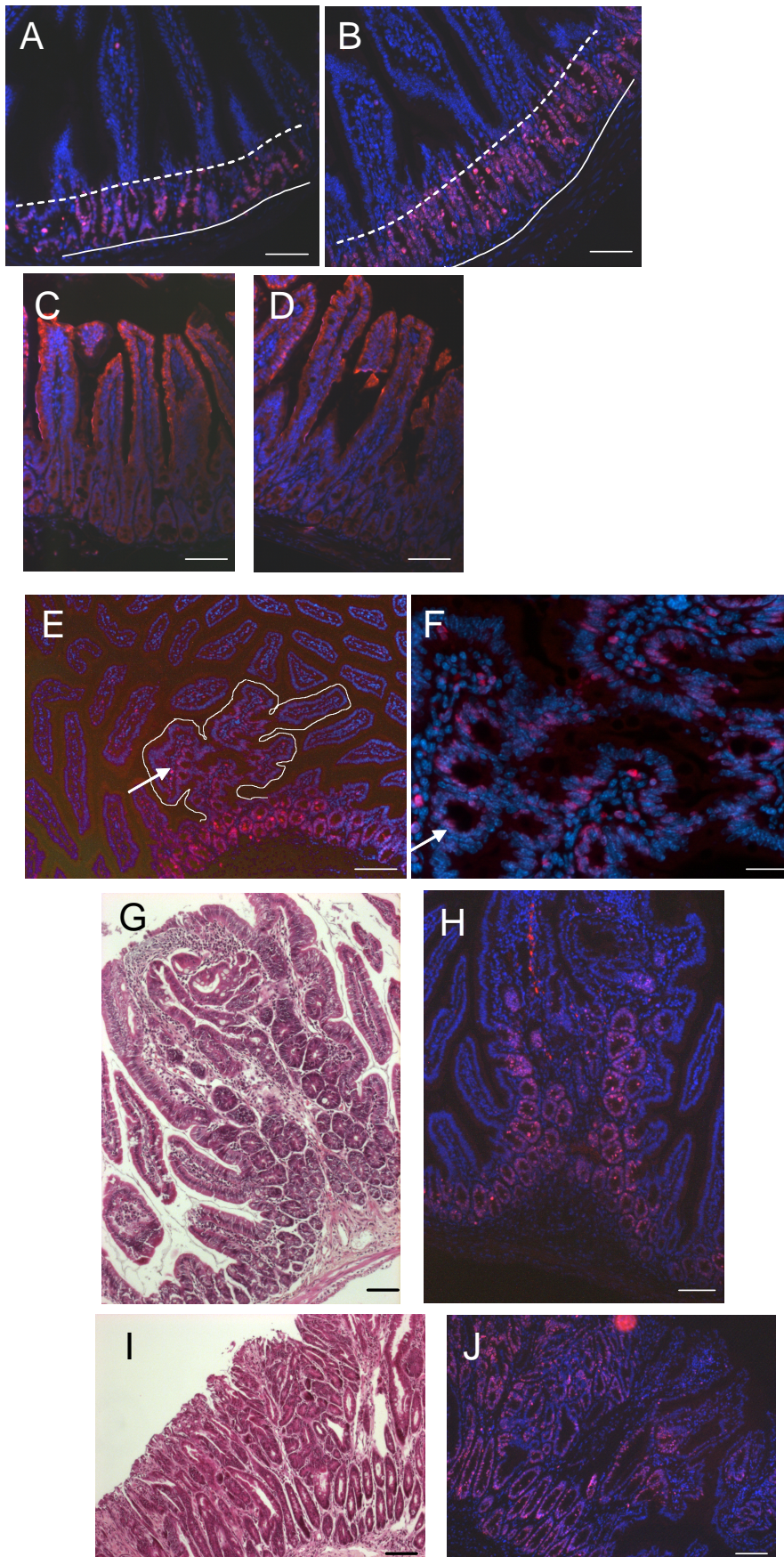


**Figure 2:**





**Figure 3:**





## **DISCUSSION et PERSPECTIVES**

# **I. La voie des hormones thyroïdiennes : un régulateur majeur de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine dans l'épithélium intestinal**

## ***A. Le contrôle de l'expression de la $\beta$ -caténine***

L'analyse des différentes souris mutantes pour les TR a permis de montrer que le gène TR $\alpha$  est impliqué dans la prolifération des cellules de l'épithélium intestinal. Ce contrôle dépendant de la T<sub>3</sub> est transmis par le récepteur TR $\alpha$ 1. Lorsque nous avons cherché à comprendre par qu'elle voie passait cette régulation, nous nous sommes focalisés sur la voie Wnt/ $\beta$ -caténine qui contrôle la prolifération normale et pathologique de l'épithélium intestinal. Après avoir analysé l'expression des partenaires principaux de cette voie (APC, GSK3 $\beta$ ,  $\beta$ -caténine, Tcf4, Groucho) en fonction du statut thyroïdien d'animaux WT ou invalidés pour les récepteurs aux HT, il s'est avéré que seule l'expression de  $\beta$ -caténine variait. Les gènes cibles de  $\beta$ -caténine, comme *c-myc* et *cycline D1* suivaient le même patron d'expression suivant le génotype et le statut hormonal. La prolifération des cellules épithéliales des cryptes intestinales était également accrue chez les souris hyperthyroïdiennes et diminuées chez les souris hypothyroïdiennes. Par la suite, une analyse menée *in vitro* sur des cultures primaires de cellules épithéliales traitées ou non aux HT et à la cycloheximide a montré que la régulation de l'expression de  $\beta$ -caténine par TR $\alpha$ 1 était cellule-épithéliale autonome et directe. Nous avons pu démontrer par gel retard et précipitation de chromatine que TR $\alpha$ 1 se fixait sur un TRE présent dans l'intron 1 du gène de la  $\beta$ -caténine en présence de T<sub>3</sub>. Nous avons mis en évidence à ce moment-là une régulation directe de l'expression de  $\beta$ -caténine par TR $\alpha$ 1. Cependant, nous avons vu dans l'introduction que la  $\beta$ -caténine est l'effecteur intracellulaire de la voie Wnt. Une simple augmentation de son expression ne suffit pas à expliquer son activation et le fait qu'elle déclenche toute la cascade des gènes cibles et

de la prolifération cellulaire. Lorsque j'ai commencé ma thèse, cette question restait sans réponse.

Nous avons vu dans l'introduction que l'activation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine est régulée par d'autres voies de signalisation, notamment BMP et Hedgehog. Cependant, ces voies impliquent un dialogue entre le tissu conjonctif et l'épithélium, or nous savions que la régulation de  $\beta$ -caténine était cellule épithéliale-autonome, donc nous pouvions *a priori* écarter ces mécanismes précis. Afin d'avoir une vue d'ensemble des gènes cibles de TR $\alpha$ 1 et des HT dans les cellules des cryptes intestinales, nous avons choisi une approche transcriptomique.

## ***B. Le contrôle de l'activation de la $\beta$ -caténine***

Comme il a été dit dans la partie introductive, l'épithélium intestinal est organisé, d'un point de vue morphologique et fonctionnel, en deux compartiments, le compartiment prolifératif et le compartiment différencié. Les cellules épithéliales dans ces deux compartiments ont des fonctions très différentes : les entérocytes, par exemple, ont fonction d'absorption et de digestion des nutriments; les cellules souches et les cellules en prolifération, ont une fonction de maintien de l'épithélium par un renouvellement continu. Il en résulte que les profils d'expression de gènes des cellules épithéliales dans ces deux compartiments sont très distincts. Afin d'analyser les gènes cibles des HT dans les progéniteurs épithéliaux, il était donc impossible de travailler sur un épithélium isolé, et encore moins sur l'intestin total. L'utilisation de cultures primaires d'épithélium n'était pas non plus une solution satisfaisante dans la mesure où il s'agit d'un modèle *in vitro*, avec toutes les limites que cela implique. Les méthodes existantes de fractionnement de l'épithélium ne garantissaient pas une pureté de population suffisante à l'étude que nous voulions mener. Nous avons donc choisi de travailler sur des cellules de cryptes intestinales récoltées par microdissection laser. Afin d'éviter la contamination des cryptes

par des cellules de Paneth, nous avons utilisé des souris âgées de deux semaines, âge auquel les cryptes sont parfaitement formées mais les cellules de Paneth pas encore différenciées. Après récolte d'un échantillonnage statistiquement acceptable pour l'analyse du transcriptome, nous avons obtenus les résultats présentés dans le deuxième article.

Parmi les gènes cibles des HT identifiés par analyse statistique et validés par QPCR, nous avons remarqué sFRP2 pour plusieurs raisons. La première était que c'est un des gènes dont l'expression est la plus augmentée en présence de HT comparé à la condition contrôle. Par ailleurs, sFRP2 est généralement considéré comme un inhibiteur de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine (cf. introduction, première partie II.A.1. et figure 5A). Cette protéine a en effet une structure proche de celle du récepteur Fzd, et a la capacité de piéger les ligands Wnt, les empêchant ainsi d'activer la voie. Cependant, des études menées sur des glandes mammaires de chien ainsi que sur du myocarde ont montré que sFRP2 pouvait avoir un rôle activateur de la prolifération (Lee et al. 2003; Mirotsov et al. 2007).

Les analyses menées *in vivo* et *in vitro* décrites dans le deuxième article montrent que le gène *sFRP2* est bien une cible cellule épithéliale-autonome directe de TR $\alpha$ 1, et que la protéine sFRP2 active la translocation nucléaire de  $\beta$ -caténine, ainsi que ses gènes cibles et que la prolifération des cellules de l'épithélium intestinal. Nous avons donc établi un modèle dans lequel TR $\alpha$ 1 active l'expression de  $\beta$ -caténine d'un côté et de sFRP2 de l'autre. Par un mécanisme encore inconnu, sFRP2 stabilise la  $\beta$ -caténine et active ainsi la prolifération des cellules de l'épithélium intestinal. La compréhension de ce mécanisme fera l'objet d'investigations ultérieures dans l'équipe. Il est cependant possible d'avancer l'hypothèse que sFRP2 agirait via Fzd. Il y a en effet des données indiquant qu'il peut exister une interaction directe entre les sFRP et le récepteur Fzd. Dans tous les cas, notre étude montre qu'il existe une voie alternative au facteur Wnt pour activer la  $\beta$ -caténine, et que cette voie est contrôlée par TR $\alpha$ 1 et les HT.

### ***C. Les autres partenaires à étudier***

Parmi la liste des gènes cibles des HT dans les cellules des cryptes intestinales, se trouvent également d'autres partenaires de la voie Wnt, comme Fzd2, Dkk3, Dvl1, EphA4, Wnt5b. Lors de l'analyse par voies de signalisation, la présence de la voie Wnt canonique dans les gènes cibles des HT a été la plus statistiquement soutenue. Ces données laissent penser que le dialogue pour le contrôle de la prolifération entre la voie hormonale et la voie Wnt implique encore d'autres molécules.

## **II. La voie des hormones thyroïdiennes : un acteur majeur de l'homéostasie épithéliale**

### ***A. La régénération de l'épithélium***

Nous avons vu dans l'introduction que l'homéostasie de l'épithélium intestinal est très finement régulée afin de garantir sa fonction de base, l'absorption de nutriments. Dans les cas de radiothérapie de l'abdomen, les cellules en prolifération subissent des dommages à l'ADN et meurent par apoptose. Afin de restaurer les fonctions de l'intestin, l'épithélium doit se régénérer en modulant une balance entre apoptose et prolifération. Nous avons montré que le gène *TRα* joue un rôle important dans ce processus de régénération, à la fois en activant la prolifération, mais également en contribuant à l'élimination des cellules endommagées. L'étude que nous avons menée démontre que *TRα* joue un rôle dans le maintien de l'homéostasie en conditions normales, mais également en cas de perturbation du système. Cela montre une fois de plus l'importance des HT et des TR dans la physiologie de l'intestin.

De plus cette étude ouvre des perspectives en médecine humaine, car elle donne une piste pour favoriser la rapidité de la régénération, et ainsi limiter les effets secondaires liés à la radiothérapie.

## ***B. La prolifération de l'épithélium***

Nous avons vu dans la première partie que les HT et TR $\alpha$ 1 sont des acteurs majeurs du contrôle de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine, et donc de la prolifération des cellules épithéliales intestinales. Cependant, étant donnée la complexité des régulations croisées entre les différentes voies de signalisation, et le fait que les voies BMP et Hedgehog sont très représentées dans l'analyse Ingenuity, la régulation de la prolifération par les HT ne se limite certainement pas à une régulation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine.

Les souris TR $\alpha$  KO présentent un défaut de prolifération des cellules des cryptes à partir de leur naissance. Elles ont cependant des cryptes présentes et capables de générer les quatre cytotypes différenciés. Nous pouvons en déduire que les produits du gène TR $\alpha$  ne sont pas indispensables au maintien des cellules souches intestinales. Afin de mieux comprendre le rôle de TR $\alpha$ 1 dans la régulation de l'homéostasie du compartiment prolifératif, nous avons généré des souris transgéniques qui surexpriment l'ADNc TR $\alpha$ 1 dans l'épithélium intestinal. En plus d'avoir une prolifération accrue dans les cryptes, ces souris ont des villosités anormales, avec des cryptes ectopiques qui génèrent même des villosités dans un axe aberrant. Ce phénotype rappelle beaucoup celui de souris mutantes pour les voies BMP ou PTEN (He et al. 2004; He et al. 2007). Par ailleurs, la voie BMP/TGF $\beta$  est la deuxième principale voie retrouvée dans l'analyse Ingenuity faite sur les données transcriptomiques. Les deux gènes BMP (BMP2 et BMP7) que l'on a identifiés parmi les gènes cibles des HT sont régulés négativement. Des données récentes ont montré une implication de BMP7 dans la régulation de l'homéostasie de l'épithélium de la prostate ainsi qu'un rôle dans le traitement des métastases osseuses du cancer de la prostate (Buijs et al. 2007). BMP2 est important dans la différenciation du stroma utérin lors de l'implantation de l'embryon (Li et al. 2007). Nous pouvons penser que chez les souris Vill-TR $\alpha$ 1 ces gènes sont réprimés, ce qui favoriserait la

multiplication des cellules souches et donc la présence de cryptes ectopiques et de polypes, selon un processus similaire à celui identifié par He et collaborateurs.

Par ailleurs, de nombreux gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire sont également régulés par les HT : Fos, certaines cyclines, des inhibiteurs des cyclines etc. Nous avons également mis en évidence des gènes nécessaires à la division cellulaire (formation du fuseau mitotique etc.). Toutes ces données vont dans le sens d'un rôle majeur de TR $\alpha$ 1 et des HT dans la régulation de la prolifération des cellules de l'épithélium intestinal. Les données transcriptomiques obtenues lors de ma thèse ouvrent un très large champ d'investigations pour les travaux futurs de l'équipe.

### ***C. Les HT, les TR et les cancers intestinaux***

La compréhension du rôle des HT et des TR dans la régulation de la prolifération de l'épithélium intestinal a ouvert une nouvelle perspective sur le potentiel de TR $\alpha$ 1 comme inducteur de tumeurs. Nous avons vu dans le troisième article que les animaux Vill-TR $\alpha$ 1 étaient susceptibles de développer des polypes ainsi que des adénomes, mais pas d'adénocarcinomes. Ces données indiquent d'une part que l'altération du niveau d'expression de TR $\alpha$ 1 dans l'épithélium intestinal est insuffisante pour initier la transformation cancéreuse, et d'autre part qu'elle crée un terrain favorable à une instabilité génomique. En effet, les cellules hyperprolifératives de l'épithélium échappent aux points de contrôle du cycle cellulaire et subissent des mutations aléatoires. Lorsqu'un progéniteur prolifératif porte une mutation dans un des gènes régulateurs de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine, cela provoque l'engagement dans le chemin vers la carcinogénèse (voir Figure 7 de l'introduction et paragraphe II.D.3.).

L'altération de l'expression de TR $\alpha$ 1 peut être la conséquence d'une mutation du gène ou du promoteur. Ce serait un événement très précoce dans la tumorigénèse intestinale, insuffisant en soi pour induire un cancer, mais favorisant l'apparition des autres mutations.

Des analyses seront également menées en physiopathologie humaine grâce à un programme d'étude de tumeurs humaines gastro-intestinales, en collaboration avec le Professeur J.Y. Scoazec, Laboratoire Central d'Anatomie Pathologique, Hôpital Edouard Herriot de Lyon.

Si les données chez l'humain confirment notre hypothèse, l'expression de TR $\alpha$ 1 sera alors un indicateur très précieux pour le dépistage précoce des pathologies cancéreuses, ainsi qu'une cible thérapeutique.



# Bibliographie

- Andersson, M.L. and Vennstrom, B. 1997. Chicken thyroid hormone receptor alpha requires the N-terminal amino acids for exclusive nuclear localization. *FEBS letters* **416**(3): 291-296.
- Bach, S.P., Renahan, A.G., and Potten, C.S. 2000. Stem cells: the intestinal stem cell as a paradigm. *Carcinogenesis* **21**(3): 469-476.
- Barker, N. and Clevers, H. 2006. Mining the Wnt pathway for cancer therapeutics. *Nature reviews* **5**(12): 997-1014.
- Barker, N., van Es, J.H., Kuipers, J., Kujala, P., van den Born, M., Cozijnsen, M., Haegebarth, A., Korving, J., Begthel, H., Peters, P.J., and Clevers, H. 2007. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature*.
- Bassett, J.H. and Williams, G.R. 2003. The molecular actions of thyroid hormone in bone. *Trends Endocrinol Metab* **14**(8): 356-364.
- Berghagen, H., Ragnhildstveit, E., Krogsrud, K., Thuestad, G., Apriletti, J., and Saatcioglu, F. 2002. Corepressor SMRT functions as a coactivator for thyroid hormone receptor T3Ralpha from a negative hormone response element. *The Journal of biological chemistry* **277**(51): 49517-49522.
- Bettess, M.D., Dubois, N., Murphy, M.J., Dubey, C., Roger, C., Robine, S., and Trump, A. 2005. c-Myc is required for the formation of intestinal crypts but dispensable for homeostasis of the adult intestinal epithelium. *Mol Cell Biol* **25**(17): 7868-7878.
- Bitgood, M.J. and McMahon, A.P. 1995. Hedgehog and Bmp genes are coexpressed at many diverse sites of cell-cell interaction in the mouse embryo. *Dev Biol* **172**(1): 126-138.
- Brent, G. 1994. The molecular basis of thyroid hormone action. *New England Journal of Medicine* **331**: 847-853.
- Brittan, M. and Wright, N.A. 2002. Gastrointestinal stem cells. *J Pathol* **197**(4): 492-509.
- Brown, D.D. and Cai, L. 2007. Amphibian metamorphosis. *Dev Biol* **306**(1): 20-33.
- Buchholz, D.R., Paul, B.D., Fu, L., and Shi, Y.B. 2006. Molecular and developmental analyses of thyroid hormone receptor function in *Xenopus laevis*, the African clawed frog. *General and comparative endocrinology* **145**(1): 1-19.
- Buijs, J.T., Rentsch, C.A., van der Horst, G., van Overveld, P.G., Wetterwald, A., Schwaninger, R., Henriquez, N.V., Ten Dijke, P., Borovecki, F., Markwalder, R., Thalmann, G.N., Papapoulos, S.E., Pelger, R.C., Vukicevic, S., Cecchini, M.G., Lowik, C.W., and van der Pluijm, G. 2007. BMP7, a putative regulator of epithelial homeostasis in the human prostate, is a potent inhibitor of prostate cancer bone metastasis in vivo. *The American journal of pathology* **171**(3): 1047-1057.
- Burma, S. and Chen, D.J. 2004. Role of DNA-PK in the cellular response to DNA double-strand breaks. *DNA repair* **3**(8-9): 909-918.
- Cadigan, K.M. and Liu, Y.I. 2006. Wnt signaling: complexity at the surface. *J Cell Sci* **119**(Pt 3): 395-402.
- Chassande, O., Fraichard, A., Gauthier, K., Flamant, F., Legrand, C., Savatier, P., Laudet, V., and Samarut, J. 1997. Identification of transcripts initiated from an internal promoter in the c-erbA alpha locus that encode inhibitors of retinoic acid receptor-alpha and triiodothyronine receptor activities. *Mol Endocrinol* **11**(9): 1278-1290.

- Chen, J.D. and Evans, R.M. 1995. A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature* **377**(6548): 454-457.
- Crosnier, C., Stamatakis, D., and Lewis, J. 2006. Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control. *Nat Rev Genet* **7**(5): 349-359.
- Dale, T.C. 1998. Signal transduction by the Wnt family of ligands. *The Biochemical journal* **329** ( Pt 2): 209-223.
- Davis, A.C., Wims, M., Spotts, G.D., Hann, S.R., and Bradley, A. 1993. A null c-myc mutation causes lethality before 10.5 days of gestation in homozygotes and reduced fertility in heterozygous female mice. *Genes Dev* **7**(4): 671-682.
- de Santa Barbara, P., van den Brink, G.R., and Roberts, D.J. 2003. Development and differentiation of the intestinal epithelium. *Cell Mol Life Sci* **60**(7): 1322-1332.
- Dimitriadis, G., Mitrou, P., Lambadiari, V., Boutati, E., Maratou, E., Panagiotakos, D.B., Koukkou, E., Tzanela, M., Thalassinou, N., and Raptis, S.A. 2006. Insulin action in adipose tissue and muscle in hypothyroidism. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **91**(12): 4930-4937.
- Eckey, M., Moehren, U., and Banihmad, A. 2003. Gene silencing by the thyroid hormone receptor. *Molecular and cellular endocrinology* **213**(1): 13-22.
- Feng, W., Ribeiro, R.C., Wagner, R.L., Nguyen, H., Apriletti, J.W., Fletterick, R.J., Baxter, J.D., Kushner, P.J., and West, B.L. 1998. Hormone-dependent coactivator binding to a hydrophobic cleft on nuclear receptors. *Science (New York, NY)* **280**(5370): 1747-1749.
- Flamant, F., Gauthier, K., and Samarut, J. 2007. Thyroid hormones signaling is getting more complex: STORMs are coming. *Mol Endocrinol* **21**(2): 321-333.
- Flamant, F., Poguet, A.L., Plateroti, M., Chassande, O., Gauthier, K., Streichenberger, N., Mansouri, A., and Samarut, J. 2002. Congenital hypothyroid Pax8(-/-) mutant mice can be rescued by inactivating the TRalpha gene. *Mol Endocrinol* **16**(1): 24-32.
- Flamant, F. and Samarut, J. 2003. Thyroid hormone receptors: lessons from knockout and knock-in mutant mice. *Trends Endocrinol Metab* **14**(2): 85-90.
- Fondell, J.D., Roy, A.L., and Roeder, R.G. 1993. Unliganded thyroid hormone receptor inhibits formation of a functional preinitiation complex: implications for active repression. *Genes Dev* **7**(7B): 1400-1410.
- Forrest, D., Reh, T.A., and Rusch, A. 2002. Neurodevelopmental control by thyroid hormone receptors. *Current opinion in neurobiology* **12**(1): 49-56.
- Fre, S., Huyghe, M., Mourikis, P., Robine, S., Louvard, D., and Artavanis-Tsakonas, S. 2005. Notch signals control the fate of immature progenitor cells in the intestine. *Nature* **435**(7044): 964-968.
- Fredric, E. and Wondisford, M. 2004. Lessons learned from TR-beta mutant mice. in *Syndromes of hormone resistance on the hypothalamic-pituitary-thyroid axis* (ed. P. Beck-Peccoz), pp. 109-118. Kluwer Academic Publishers.
- Freedberg, A. and Halmolsky, M. 1974. Effects of thyroid hormone on certain non endocrine organ systems. in *Handbook of Physiology - Endocrinology- Thyroid* (ed. M.E.G.a.E. Solomon), pp. 435-468. American Physiological Society, Washington, D.C.
- Fu, L., Ishizuya-Oka, A., Buchholz, D.R., Amano, T., Matsuda, H., and Shi, Y.B. 2005. A causative role of stromelysin-3 in extracellular matrix remodeling and epithelial apoptosis during intestinal metamorphosis in *Xenopus laevis*. *The Journal of biological chemistry* **280**(30): 27856-27865.
- Furlow, J.D. and Neff, E.S. 2006. A developmental switch induced by thyroid hormone: *Xenopus laevis* metamorphosis. *Trends Endocrinol Metab* **17**(2): 40-47.

- Gazit, R., Krizhanovsky, V., and Ben-Arie, N. 2004. Math1 controls cerebellar granule cell differentiation by regulating multiple components of the Notch signaling pathway. *Development (Cambridge, England)* **131**(4): 903-913.
- Glass, C.K. 1994. Differential recognition of target genes by nuclear receptor monomers, dimers, and heterodimers. *Endocrine reviews* **15**(3): 391-407.
- Gonzalez-Sancho, J.M., Garcia, V., Bonilla, F., and Munoz, A. 2003. Thyroid hormone receptors/THR genes in human cancer. *Cancer Lett* **192**(2): 121-132.
- Grapin-Botton, A. and Melton, D.A. 2000. Endoderm development: from patterning to organogenesis. *Trends Genet* **16**(3): 124-130.
- Gregorieff, A. and Clevers, H. 2005. Wnt signaling in the intestinal epithelium: from endoderm to cancer. *Genes Dev* **19**(8): 877-890.
- Gullberg, H., Rudling, M., Salto, C., Forrest, D., Angelin, B., and Vennstrom, B. 2002. Requirement for thyroid hormone receptor beta in T3 regulation of cholesterol metabolism in mice. *Mol Endocrinol* **16**(8): 1767-1777.
- Hadj-Sahraoui, N., Seugnet, I., Ghorbel, M.T., and Demeneix, B. 2000. Hypothyroidism prolongs mitotic activity in the post-natal mouse brain. *Neuroscience letters* **280**(2): 79-82.
- Haegel, H., Larue, L., Ohsugi, M., Fedorov, L., Herrenknecht, K., and Kemler, R. 1995. Lack of beta-catenin affects mouse development at gastrulation. *Development (Cambridge, England)* **121**(11): 3529-3537.
- Haramis, A.P., Begthel, H., van den Born, M., van Es, J., Jonkheer, S., Offerhaus, G.J., and Clevers, H. 2004. De novo crypt formation and juvenile polyposis on BMP inhibition in mouse intestine. *Science (New York, NY)* **303**(5664): 1684-1686.
- Hauck, A.L., Swanson, K.S., Kenis, P.J., Leckband, D.E., Gaskins, H.R., and Schook, L.B. 2005. Twists and turns in the development and maintenance of the mammalian small intestine epithelium. *Birth Defects Res C Embryo Today* **75**(1): 58-71.
- He, T.C., Sparks, A.B., Rago, C., Hermeking, H., Zawel, L., da Costa, L.T., Morin, P.J., Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. 1998. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science (New York, NY)* **281**(5382): 1509-1512.
- He, X.C., Yin, T., Grindley, J.C., Tian, Q., Sato, T., Tao, W.A., Dirisina, R., Porter-Westpfahl, K.S., Hembree, M., Johnson, T., Wiedemann, L.M., Barrett, T.A., Hood, L., Wu, H., and Li, L. 2007. PTEN-deficient intestinal stem cells initiate intestinal polyposis. *Nat Genet* **39**(2): 189-198.
- He, X.C., Zhang, J., Tong, W.G., Tawfik, O., Ross, J., Scoville, D.H., Tian, Q., Zeng, X., He, X., Wiedemann, L.M., Mishina, Y., and Li, L. 2004. BMP signaling inhibits intestinal stem cell self-renewal through suppression of Wnt-beta-catenin signaling. *Nat Genet* **36**(10): 1117-1121.
- Horlein, A.J., Naar, A.M., Heinzl, T., Torchia, J., Gloss, B., Kurokawa, R., Ryan, A., Kamei, Y., Soderstrom, M., Glass, C.K., and et al. 1995. Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature* **377**(6548): 397-404.
- Howe, J.R., Roth, S., Ringold, J.C., Summers, R.W., Jarvinen, H.J., Sistonen, P., Tomlinson, I.P., Houlston, R.S., Bevan, S., Mitros, F.A., Stone, E.M., and Aaltonen, L.A. 1998. Mutations in the SMAD4/DPC4 gene in juvenile polyposis. *Science (New York, NY)* **280**(5366): 1086-1088.
- Hult, J., Wang, C., Li, Z., Albanese, C., Rao, M., Di Vizio, D., Shah, S., Byers, S.W., Mahmood, R., Augenlicht, L.H., Russell, R., and Pestell, R.G. 2004. Cyclin D1 genetic heterozygosity regulates colonic epithelial cell differentiation and tumor number in ApcMin mice. *Mol Cell Biol* **24**(17): 7598-7611.

- Iishi, H., Tatsuta, M., Baba, M., Okuda, S., and Taniguchi, H. 1992. Enhancement by thyroxine of experimental carcinogenesis induced in rat colon by azoxymethane. *International journal of cancer* **50**(6): 974-976.
- Ireland, H., Kemp, R., Houghton, C., Howard, L., Clarke, A.R., Sansom, O.J., and Winton, D.J. 2004. Inducible Cre-mediated control of gene expression in the murine gastrointestinal tract: effect of loss of beta-catenin. *Gastroenterology* **126**(5): 1236-1246.
- Ishizuya-Oka, A. 2007. Regeneration of the amphibian intestinal epithelium under the control of stem cell niche. *Development, growth & differentiation* **49**(2): 99-107.
- Ishizuya-Oka, A., Hasebe, T., Shimizu, K., Suzuki, K., and Ueda, S. 2006. Shh/BMP-4 signaling pathway is essential for intestinal epithelial development during *Xenopus* larval-to-adult remodeling. *Dev Dyn* **235**(12): 3240-3249.
- Ishizuya-Oka, A., Li, Q., Amano, T., Damjanovski, S., Ueda, S., and Shi, Y.B. 2000. Requirement for matrix metalloproteinase stromelysin-3 in cell migration and apoptosis during tissue remodeling in *Xenopus laevis*. *The Journal of cell biology* **150**(5): 1177-1188.
- Ishizuya-Oka, A. and Shi, Y.B. 2005. Molecular mechanisms for thyroid hormone-induced remodeling in the amphibian digestive tract: a model for studying organ regeneration. *Development, growth & differentiation* **47**(9): 601-607.
- Ishizuya-Oka, A., Shimizu, K., Sakakibara, S., Okano, H., and Ueda, S. 2003. Thyroid hormone-upregulated expression of Musashi-1 is specific for progenitor cells of the adult epithelium during amphibian gastrointestinal remodeling. *J Cell Sci* **116**(Pt 15): 3157-3164.
- Ishizuya-Oka, A., Ueda, S., Amano, T., Shimizu, K., Suzuki, K., Ueno, N., and Yoshizato, K. 2001a. Thyroid-hormone-dependent and fibroblast-specific expression of BMP-4 correlates with adult epithelial development during amphibian intestinal remodeling. *Cell and tissue research* **303**(2): 187-195.
- Ishizuya-Oka, A., Ueda, S., Inokuchi, T., Amano, T., Damjanovski, S., Stelow, M., and Shi, Y.B. 2001b. Thyroid hormone-induced expression of sonic hedgehog correlates with adult epithelial development during remodeling of the *Xenopus* stomach and intestine. *Differentiation; research in biological diversity* **69**(1): 27-37.
- Janssen, K.P., el-Marjou, F., Pinto, D., Sastre, X., Rouillard, D., Fouquet, C., Soussi, T., Louvard, D., and Robine, S. 2002. Targeted expression of oncogenic K-ras in intestinal epithelium causes spontaneous tumorigenesis in mice. *Gastroenterology* **123**(2): 492-504.
- Jensen, J., Pedersen, E.E., Galante, P., Hald, J., Heller, R.S., Ishibashi, M., Kageyama, R., Guillemot, F., Serup, P., and Madsen, O.D. 2000. Control of endodermal endocrine development by Hes-1. *Nat Genet* **24**(1): 36-44.
- Johansson, C., Vennstrom, B., and Thoren, P. 1998. Evidence that decreased heart rate in thyroid hormone receptor-alpha1-deficient mice is an intrinsic defect. *Am J Physiol* **275**(2 Pt 2): R640-646.
- Jones, R.G., Li, X., Gray, P.D., Kuang, J., Clayton, F., Samowitz, W.S., Madison, B.B., Gumucio, D.L., and Kuwada, S.K. 2006. Conditional deletion of beta1 integrins in the intestinal epithelium causes a loss of Hedgehog expression, intestinal hyperplasia, and early postnatal lethality. *The Journal of cell biology* **175**(3): 505-514.
- Karam, S.M. 1999. Lineage commitment and maturation of epithelial cells in the gut. *Front Biosci* **4**: D286-298.
- Kawano, Y. and Kypta, R. 2003. Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. *J Cell Sci* **116**(Pt 13): 2627-2634.
- Kayahara, T., Sawada, M., Takaishi, S., Fukui, H., Seno, H., Fukuzawa, H., Suzuki, K., Hiai, H., Kageyama, R., Okano, H., and Chiba, T. 2003. Candidate markers for

stem and early progenitor cells, Musashi-1 and Hes1, are expressed in crypt base columnar cells of mouse small intestine. *FEBS letters* **535**(1-3): 131-135.

- Koenig, R.J., Lazar, M.A., Hodin, R.A., Brent, G.A., Larsen, P.R., Chin, W.W., and Moore, D.D. 1989. Inhibition of thyroid hormone action by a non-hormone binding c-erbA protein generated by alternative mRNA splicing. *Nature* **337**(6208): 659-661.
- Korinek, V., Barker, N., Moerer, P., van Donselaar, E., Huls, G., Peters, P.J., and Clevers, H. 1998. Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4. *Nat Genet* **19**(4): 379-383.
- Laudet, V., Hanni, C., Coll, J., Catzeflis, F., and Stehelin, D. 1992. Evolution of the nuclear receptor gene superfamily. *The EMBO journal* **11**(3): 1003-1013.
- Lee, J.L., Chang, C.J., Chueh, L.L., and Lin, C.T. 2003. Expression of secreted frizzled-related protein 2 in a primary canine mammary tumor cell line: a candidate tumor marker for mammary tumor cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **39**(5-6): 221-227.
- Leedham, S.J., Brittan, M., McDonald, S.A., and Wright, N.A. 2005. Intestinal stem cells. *J Cell Mol Med* **9**(1): 11-24.
- Li, Q., Kannan, A., Wang, W., Demayo, F.J., Taylor, R.N., Bagchi, M.K., and Bagchi, I.C. 2007. Bone Morphogenetic Protein 2 Functions via a Conserved Signaling Pathway Involving Wnt4 to Regulate Uterine Decidualization in the Mouse and the Human. *The Journal of biological chemistry* **282**(43): 31725-31732.
- Liu, A. and Niswander, L.A. 2005. Bone morphogenetic protein signalling and vertebrate nervous system development. *Nat Rev Neurosci* **6**(12): 945-954.
- Loeb, J. 2000. Metabolic changes in hypothyroidism. in *The thyroid, a fundamental and clinical text* (ed. L. Braverman and R. Utiger), pp. 858-865. Lippincott-Raven, New York.
- Madison, B.B., Braunstein, K., Kuizon, E., Portman, K., Qiao, X.T., and Gumucio, D.L. 2005. Epithelial hedgehog signals pattern the intestinal crypt-villus axis. *Development (Cambridge, England)* **132**(2): 279-289.
- Mangelsdorf, D.J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schutz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., Chambon, P., and Evans, R.M. 1995. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* **83**(6): 835-839.
- Mansouri, A., Chowdhury, K., and Gruss, P. 1998. Follicular cells of the thyroid gland require Pax8 gene function. *Nat Genet* **19**(1): 87-90.
- Markowitz, S., Haut, M., Stellato, T., Gerbic, C., and Molkenstein, K. 1989. Expression of the ErbA-beta class of thyroid hormone receptors is selectively lost in human colon carcinoma. *J Clin Invest* **84**(5): 1683-1687.
- McKenna, N.J., Lanz, R.B., and O'Malley, B.W. 1999. Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocrine reviews* **20**(3): 321-344.
- Mills, J.C. and Gordon, J.I. 2001. The intestinal stem cell niche: there grows the neighborhood. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(22): 12334-12336.
- Mirotsov, M., Zhang, Z., Deb, A., Zhang, L., Gneccchi, M., Noiseux, N., Mu, H., Pachori, A., and Dzau, V. 2007. Secreted frizzled related protein 2 (Sfrp2) is the key Akt-mesenchymal stem cell-released paracrine factor mediating myocardial survival and repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(5): 1643-1648.
- Moon, R.T., Kohn, A.D., De Ferrari, G.V., and Kaykas, A. 2004. WNT and beta-catenin signalling: diseases and therapies. *Nat Rev Genet* **5**(9): 691-701.
- Morte, B., Manzano, J., Scanlan, T., Vennstrom, B., and Bernal, J. 2002. Deletion of the thyroid hormone receptor alpha 1 prevents the structural alterations of the cerebellum induced by hypothyroidism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(6): 3985-3989.
- Muncan, V., Sansom, O.J., Tertoolen, L., Phesse, T.J., Begthel, H., Sancho, E., Cole, A.M., Gregorieff, A., de Alboran, I.M., Clevers, H., and Clarke, A.R. 2006. Rapid loss

of intestinal crypts upon conditional deletion of the Wnt/Tcf-4 target gene c-Myc. *Mol Cell Biol* **26**(22): 8418-8426.

- Nagy, L., Kao, H.Y., Chakravarti, D., Lin, R.J., Hassig, C.A., Ayer, D.E., Schreiber, S.L., and Evans, R.M. 1997. Nuclear receptor repression mediated by a complex containing SMRT, mSin3A, and histone deacetylase. *Cell* **89**(3): 373-380.
- Nakamura, T., Tsuchiya, K., and Watanabe, M. 2007. Crosstalk between Wnt and Notch signaling in intestinal epithelial cell fate decision. *Journal of gastroenterology* **42**(9): 705-710.
- O'Hara, A.M. and Shanahan, F. 2006. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO reports* **7**(7): 688-693.
- Onate, S.A., Tsai, S.Y., Tsai, M.J., and O'Malley, B.W. 1995. Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. *Science (New York, NY)* **270**(5240): 1354-1357.
- Ormestad, M., Astorga, J., Landgren, H., Wang, T., Johansson, B.R., Miura, N., and Carlsson, P. 2006. Foxf1 and Foxf2 control murine gut development by limiting mesenchymal Wnt signaling and promoting extracellular matrix production. *Development (Cambridge, England)* **133**(5): 833-843.
- Patterson, D., Hayes, W.P., and Shi, Y.B. 1995. Transcriptional activation of the matrix metalloproteinase gene stromelysin-3 coincides with thyroid hormone-induced cell death during frog metamorphosis. *Dev Biol* **167**(1): 252-262.
- Pinto, D. and Clevers, H. 2005a. Wnt control of stem cells and differentiation in the intestinal epithelium. *Exp Cell Res* **306**(2): 357-363.
- -. 2005b. Wnt, stem cells and cancer in the intestine. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* **97**(3): 185-196.
- Pinto, D., Gregorieff, A., Begthel, H., and Clevers, H. 2003. Canonical Wnt signals are essential for homeostasis of the intestinal epithelium. *Genes Dev* **17**(14): 1709-1713.
- Pinto, D., Robine, S., Jaisser, F., El Marjou, F.E., and Louvard, D. 1999. Regulatory sequences of the mouse villin gene that efficiently drive transgenic expression in immature and differentiated epithelial cells of small and large intestines. *The Journal of biological chemistry* **274**(10): 6476-6482.
- Plateroti, M., Angelin-Duclos, C., Flamant, F., and Samarut, J. 2004. Tissues specific action of thyroid hormones, insights from knock out animal models. in *Syndromes of hormone resistance on the hypothalamic-pituitary-thyroid axis* (ed. P. Beck-Peccoz), pp. 13-34. Kluwer Academic Publishers.
- Plateroti, M., Chassande, O., Fraichard, A., Gauthier, K., Freund, J.N., Samarut, J., and Keding, M. 1999. Involvement of TR $\alpha$ - and  $\beta$ -receptor subtypes in mediation of T3 functions during postnatal murine intestinal development. *Gastroenterology* **116**(6): 1367-1378.
- Plateroti, M., Gauthier, K., Domon-Dell, C., Freund, J.N., Samarut, J., and Chassande, O. 2001. Functional interference between thyroid hormone receptor  $\alpha$  (TR $\alpha$ ) and natural truncated TR $\Delta$  $\alpha$  isoforms in the control of intestine development. *Mol Cell Biol* **21**(14): 4761-4772.
- Plateroti, M., Kress, E., Mori, J.I., and Samarut, J. 2006. Thyroid hormone receptor  $\alpha$ 1 directly controls transcription of the  $\beta$ -catenin gene in intestinal epithelial cells. *Mol Cell Biol* **26**(8): 3204-3214.
- Plateroti, M., Kress, E., and Samarut, J. 2007. Specific actions of thyroid hormones during gut development: insights from animal models. *Journal of pediatric endocrinology & metabolism* **20**: 119-122.
- Potten, C.S. 2004. Radiation, the ideal cytotoxic agent for studying the cell biology of tissues such as the small intestine. *Radiation research* **161**(2): 123-136.

- Potten, C.S. and Booth, C. 1997. The role of radiation-induced and spontaneous apoptosis in the homeostasis of the gastrointestinal epithelium: a brief review. *Comparative biochemistry and physiology* **118**(3): 473-478.
- Potten, C.S., Booth, C., Tudor, G.L., Booth, D., Brady, G., Hurley, P., Ashton, G., Clarke, R., Sakakibara, S., and Okano, H. 2003. Identification of a putative intestinal stem cell and early lineage marker; musashi-1. *Differentiation; research in biological diversity* **71**(1): 28-41.
- Potten, C.S. and Loeffler, M. 1990. Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development (Cambridge, England)* **110**(4): 1001-1020.
- Potten, C.S., Owen, G., and Booth, D. 2002. Intestinal stem cells protect their genome by selective segregation of template DNA strands. *J Cell Sci* **115**(Pt 11): 2381-2388.
- Potten, C.S., Owen, G., and Roberts, S.A. 1990. The temporal and spatial changes in cell proliferation within the irradiated crypts of the murine small intestine. *International journal of radiation biology* **57**(1): 185-199.
- Powell, D.W., Mifflin, R.C., Valentich, J.D., Crowe, S.E., Saada, J.I., and West, A.B. 1999. Myofibroblasts. II. Intestinal subepithelial myofibroblasts. *Am J Physiol* **277**(2 Pt 1): C183-201.
- Rachez, C. and Freedman, L.P. 2001. Mediator complexes and transcription. *Curr Opin Cell Biol* **13**(3): 274-280.
- Radtke, F. and Clevers, H. 2005. Self-renewal and cancer of the gut: two sides of a coin. *Science (New York, NY)* **307**(5717): 1904-1909.
- Ramalho-Santos, M., Melton, D.A., and McMahon, A.P. 2000. Hedgehog signals regulate multiple aspects of gastrointestinal development. *Development (Cambridge, England)* **127**(12): 2763-2772.
- Roberts, D.J., Smith, D.M., Goff, D.J., and Tabin, C.J. 1998. Epithelial-mesenchymal signaling during the regionalization of the chick gut. *Development (Cambridge, England)* **125**(15): 2791-2801.
- Rubin, D.C. 2007. Intestinal morphogenesis. *Current opinion in gastroenterology* **23**(2): 111-114.
- Ruiz i Altaba, A., Palma, V., and Dahmane, N. 2002. Hedgehog-Gli signalling and the growth of the brain. *Nat Rev Neurosci* **3**(1): 24-33.
- Sancho, E., Batlle, E., and Clevers, H. 2003. Live and let die in the intestinal epithelium. *Curr Opin Cell Biol* **15**(6): 763-770.
- Sasai, Y., Kageyama, R., Tagawa, Y., Shigemoto, R., and Nakanishi, S. 1992. Two mammalian helix-loop-helix factors structurally related to Drosophila hairy and Enhancer of split. *Genes Dev* **6**(12B): 2620-2634.
- Satoh, T., Monden, T., Ishizuka, T., Mitsushashi, T., Yamada, M., and Mori, M. 1999. DNA binding and interaction with the nuclear receptor corepressor of thyroid hormone receptor are required for ligand-independent stimulation of the mouse preprothyrotropin-releasing hormone gene. *Molecular and cellular endocrinology* **154**(1-2): 137-149.
- Schmidt, G.H., Winton, D.J., and Ponder, B.A. 1988. Development of the pattern of cell renewal in the crypt-villus unit of chimaeric mouse small intestine. *Development (Cambridge, England)* **103**(4): 785-790.
- Schreiber, A.M., Cai, L., and Brown, D.D. 2005. Remodeling of the intestine during metamorphosis of *Xenopus laevis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(10): 3720-3725.
- Schreiber, A.M., Das, B., Huang, H., Marsh-Armstrong, N., and Brown, D.D. 2001. Diverse developmental programs of *Xenopus laevis* metamorphosis are inhibited by a dominant negative thyroid hormone receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(19): 10739-10744.

- Shi, Y.B. and Brown, D.D. 1993. The earliest changes in gene expression in tadpole intestine induced by thyroid hormone. *The Journal of biological chemistry* **268**(27): 20312-20317.
- Shi, Y.B. and Ishizuya-Oka, A. 1996. Biphasic intestinal development in amphibians: embryogenesis and remodeling during metamorphosis. *Current topics in developmental biology* **32**: 205-235.
- -. 1997. Autoactivation of Xenopus Thyroid Hormone Receptor beta Genes Correlates with Larval Epithelial Apoptosis and Adult Cell Proliferation. *J Biomed Sci* **4**(1): 9-18.
- -. 2001. Thyroid hormone regulation of apoptotic tissue remodeling: implications from molecular analysis of amphibian metamorphosis. *Progress in nucleic acid research and molecular biology* **65**: 53-100.
- Shtutman, M., Zhurinsky, J., Simcha, I., Albanese, C., D'Amico, M., Pestell, R., and Ben-Ze'ev, A. 1999. The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(10): 5522-5527.
- Simon-Assmann, P., Kedinger, M., De Arcangelis, A., Rousseau, V., and Simo, P. 1995. Extracellular matrix components in intestinal development. *Experientia* **51**(9-10): 883-900.
- Smallridge, R.C., Glinoe, D., Hollowell, J.G., and Brent, G. 2005. Thyroid function inside and outside of pregnancy: what do we know and what don't we know? *Thyroid* **15**(1): 54-59.
- St Germain, D.L. and Galton, V.A. 1997. The deiodinase family of selenoproteins. *Thyroid* **7**(4): 655-668.
- Stappenbeck, T.S., Wong, M.H., Saam, J.R., Mysorekar, I.U., and Gordon, J.I. 1998. Notes from some crypt watchers: regulation of renewal in the mouse intestinal epithelium. *Curr Opin Cell Biol* **10**(6): 702-709.
- Stolow, M.A. and Shi, Y.B. 1995. Xenopus sonic hedgehog as a potential morphogen during embryogenesis and thyroid hormone-dependent metamorphosis. *Nucleic acids research* **23**(13): 2555-2562.
- Thurston, G., Noguera-Troise, I., and Yancopoulos, G.D. 2007. The Delta paradox: DLL4 blockade leads to more tumour vessels but less tumour growth. *Nat Rev Cancer* **7**(5): 327-331.
- Tinnikov, A., Nordstrom, K., Thoren, P., Kindblom, J.M., Malin, S., Rozell, B., Adams, M., Rajanayagam, O., Pettersson, S., Ohlsson, C., Chatterjee, K., and Vennstrom, B. 2002. Retardation of post-natal development caused by a negatively acting thyroid hormone receptor alpha1. *The EMBO journal* **21**(19): 5079-5087.
- van de Wetering, M., Sancho, E., Verweij, C., de Lau, W., Oving, I., Hurlstone, A., van der Horn, K., Batlle, E., Coudreuse, D., Haramis, A.P., Tjon-Pon-Fong, M., Moerer, P., van den Born, M., Soete, G., Pals, S., Eilers, M., Medema, R., and Clevers, H. 2002. The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell* **111**(2): 241-250.
- van den Brink, G.R. 2007. Hedgehog signaling in development and homeostasis of the gastrointestinal tract. *Physiological reviews* **87**(4): 1343-1375.
- van Es, J.H., van Gijn, M.E., Riccio, O., van den Born, M., Vooijs, M., Begthel, H., Cozijnsen, M., Robine, S., Winton, D.J., Radtke, F., and Clevers, H. 2005. Notch/gamma-secretase inhibition turns proliferative cells in intestinal crypts and adenomas into goblet cells. *Nature* **435**(7044): 959-963.
- Wang, C.S., Lin, K.H., and Hsu, Y.C. 2002. Alterations of thyroid hormone receptor alpha gene: frequency and association with Nm23 protein expression and metastasis in gastric cancer. *Cancer Lett* **175**(2): 121-127.
- Williams, G.R. 2000. Cloning and characterization of two novel thyroid hormone receptor beta isoforms. *Mol Cell Biol* **20**(22): 8329-8342.



- Withers, H.R. and Elkind, M.M. 1970. Microcolony survival assay for cells of mouse intestinal mucosa exposed to radiation. *International journal of radiation biology and related studies in physics, chemistry, and medicine* **17**(3): 261-267.
- Wong, J., Liang, V.C., Sachs, L.M., and Shi, Y.B. 1998a. Transcription from the thyroid hormone-dependent promoter of the *Xenopus laevis* thyroid hormone receptor betaA gene requires a novel upstream element and the initiator, but not a TATA Box. *The Journal of biological chemistry* **273**(23): 14186-14193.
- Wong, M.H., Rubinfeld, B., and Gordon, J.I. 1998b. Effects of forced expression of an NH2-terminal truncated beta-Catenin on mouse intestinal epithelial homeostasis. *The Journal of cell biology* **141**(3): 765-777.
- Yang, Q., Bermingham, N.A., Finegold, M.J., and Zoghbi, H.Y. 2001. Requirement of Math1 for secretory cell lineage commitment in the mouse intestine. *Science (New York, NY)* **294**(5549): 2155-2158.
- Yaoita, Y. and Brown, D.D. 1990. A correlation of thyroid hormone receptor gene expression with amphibian metamorphosis. *Genes Dev* **4**(11): 1917-1924.
- Yen, P.M. 2001. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiological reviews* **81**(3): 1097-1142.
- Yen, P.M., Ando, S., Feng, X., Liu, Y., Maruvada, P., and Xia, X. 2006. Thyroid hormone action at the cellular, genomic and target gene levels. *Molecular and cellular endocrinology* **246**(1-2): 121-127.